



Maria Augusta Preto Xavier Lobo Moutinho Medeiros

Mestre

Estudo fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell.

**Síntese de cromóforos derivados de cumarinas com
possíveis aplicações em dispositivos fotovoltaicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Química
(especialidade Química Orgânica)

Orientador: Prof. Doutora Ana Lourenço, Professora auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutora Paula Branco, Professora auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Júri

Presidente: Prof. Doutora Ana Maria Félix Trindade Lobo

Arguentes: Prof. Doutora Maria de Fátima Dias Alfaiate Simões

Vogais Prof. Doutor António Manuel Deométrie Rodrigues Lourenço Pereira
Prof. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço
Doutora Maria Manuel Marinho Sequeira Barata Marques
Maria do Céu Gonçalves da Costa
Maria João Vidal de Oliveira baptista Marcelo Curto

:



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro de 2014

“Estudo fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell.”

“Síntese de cromóforos derivados de cumarinas com possíveis aplicações em dispositivos fotovoltaicos”

Maria Augusta Preto Xavier Lobo Moutinho Medeiros, *Copyright*

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

À memória dos meus Pais

Ao Pedro

Às nossas filhas

Catarina

Madalena

Mafalda

Margarida

Agradecimentos

Um agradecimento especial, no momento em que se finaliza esta dissertação de doutoramento, é devido à Professora Doutora Ana Lourenço, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Não se afigura possível, nas curtas palavras destas frases iniciais, expressar todo o reconhecimento e a enorme dívida para a pessoa que assumiu, desde o início, a tarefa de orientar esta dissertação. Foi uma presença constante e uma fonte inesgotável de ensinamentos ao longo destes anos de trabalho de investigação intenso. Foi, além disso, uma presença amiga e um factor de motivação determinante num caminho, muitas vezes, difícil e complexo.

Uma palavra muito especial merece igualmente a Professora Doutora Paula Branco, da mesma Faculdade. Num momento em que se impôs abrir um novo horizonte de trabalho no âmbito da investigação em curso, que se materializou na segunda parte desta dissertação, a Professora Doutora Paula Branco aceitou assumir, com uma dedicação e um empenho que jamais poderei esquecer, a tarefa de orientar efectivamente todo este trabalho relativo à *síntese de cromóforos derivados de cumarinas com possíveis aplicações em dispositivos fotovoltaicos*. Fê-lo de forma exemplar, apontando tantas vezes o caminho e aceitando sempre o pesado encargo de, a horas muitas vezes impróprias, apontar pistas e ajudar a visualizar possíveis soluções. Sem o seu apoio não teria sido possível concluir este trabalho.

Quero fazer também um agradecimento especial à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa por ter assegurado prontamente todas as condições necessárias ao decorrer deste trabalho e que foram determinantes para a sua conclusão.

A primeira parte da investigação foi realizada, quase na totalidade, no então Instituto de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI). Daí que não possa esquecer o apoio que esta instituição – em particular na pessoa da Doutora Maria João Marcelo Curto – sempre me deu. A segunda parte deste trabalho foi realizada no Laboratório de Energia e Geologia (LNEG) e beneficiou também do financiamento obtido no quadro dos projectos PTDC/ENR/64909/2006 e PTDC/CTM-CER/111590/2009, da responsabilidade da Doutora Maria João Brites. Daí que não possa esquecer o apoio que também esta instituição me deu. A referência especial que, neste contexto, se faz ao Doutor António Joyce - que me acolheu no seu grupo de trabalho - e ao Eng.

João Farinha Mendes - coordenador da Unidade de Energia Solar na qual me integrei - significa, pois, um agradecimento que se estende a todos e a cada um que, em cada momento, me apoiaram nesta caminhada.

Esta investigação contou ainda com a preciosa colaboração de muitas outras pessoas. À Doutora Luciane Lopes, da Universidade de Sorocaba (UNISO), quero agradecer os ensaios *in vivo* realizados. Ao Doutor João Ernesto de Carvalho, da Universidade de Campinas, agradeço a realização dos ensaios de actividade anti-neoplásica. À Doutora Virgínia Motilva, do Departamento de Farmacologia da Universidade de Sevilha, o agradecimento é devido pela realização dos ensaios da avaliação da expressão da COX-2, da produção da citocina TNF- α e da actividade da sirtuína-1. Ao Doutor Julio Gálvez, do Departamento de Farmacologia do Centro de Investigação Biomédica (CIBM) da Universidade de Granada, quero agradecer a realização dos ensaios de avaliação na produção de interleucina-8. Ao Doutor Sérgio de Mendonça, da Universidade Bandeirante de S. Paulo, o meu reconhecimento pela realização dos ensaios de avaliação de actividade antimicrobiana.

Uma palavra especial de agradecimento é também devida à Professora Doutora Ana Isabel Coutinho. Esta grande amiga de há muito, hoje professora da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, deu um apoio decisivo no momento em que se impunha realizar, no Centro de Química Física Molecular (CQFM) do Instituto Superior Técnico, sob a supervisão do Prof. Doutor Mário Nuno Berberan Santos, parceiro do LNEG nos projectos acima referidos, a avaliação de algumas propriedades fotofísicas de compostos obtidos.

Também não esqueço, nesta hora, o apoio e a amizade que a Dra. Maria do Rosário Caras Altas sempre me deu na realização dos inúmeros espectros de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais que foram realizados na FCT-UNL.

Quero igualmente agradecer à Dr^a Ana Teresa Lopes e Dr^a Cecília Bonifácio pelo contributo na obtenção dos espectros de RMN realizados nos espectrómetros pertencentes à Rede Nacional de RMN (RMNRN). À Dr^a Luz Fernandes, do Laboratório de Análises –REQUIMTE (DQ-FCT-UNL), agradeço o apoio prestado nos espectros de massa e ao Doutor Abhik Mukhopadhyay a realização dos ensaios de difracção de Raios X.

Um agradecimento é igualmente devido às minhas amigas Teresa, Olívia, Fátima, Anabela, Cristina, Maria do Céu e Célia pela amizade, ajuda e encorajamento recebidos ao longo deste percurso. Também não posso esquecer o inefável apoio que amigos de longa data, como a Rosarinho e o Günter Krause, bem como a Ângela Prazeres e a Paula Bajanca, sempre me deram.

Antes de terminar, as palavras finais de agradecimento vão para a minha família.

Ao meu pai, com enorme saudade, quero agradecer o exemplo de uma vida de luta, de persistência, de força e de esperança. À minha mãe, pela alegria, ternura, paciência, disponibilidade e apoio incondicionais que sempre me deu e que ainda hoje recordo com imensa saudade.

Aos meus irmãos, agradeço a amizade e carinho com que me apoiaram ao longo destes anos.

Às minhas filhas - Catarina, Madalena, Mafalda e Margarida - quero agradecer o apoio, a ternura e a enorme paciência.

Ao Pedro agradeço por tudo....

RESUMO

A Parte I teve como objectivo a pesquisa de novos constituintes bioactivos da planta *Solanum cernuum* Vell.

Identificaram-se, pela primeira vez no género *Solanum*, três triterpenos com um esqueleto de 31-norcicloartanona ((+)-cicloeucalenona, (+)-24-oxo-31-norcicloartanona e (+)-24(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona) e quatro alcalóides com uma unidade (2-aminopirrolidin-1-il)carboxamidina acilada com o ácido isoferúlico assumindo configurações *E* e *Z* (cernumidina, isocernumidina, cernumidina B e isocernumidina B).

A (+)-24-oxo-31-norcicloartanona apresentou actividade anti-neoplásica selectiva para as células de pulmão NCIH460, actividade anti-inflamatória relevante e uma inibição acentuada da expressão da COX-2. A (+)-24(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona apresentou também actividade para as células de leucemia K562. A cernumidina provocou inibição da interleuquina-8 (IL-8) em células do carcinoma do cólon HT-29 superior a 50%.

Foram também identificados quercitrina, afzelina, hiperina, ácido ferúlico e *N*-acetildopamina.

Na Parte II desenvolveram-se estudos sobre metodologias de síntese de novos cromóforos derivados da 7-amino-4-metilcumarina.

Foi realizado um estudo da reacção de Buchwald-Hartwig para a introdução de grupo(s) electrodoador(es) na posição 7 e de um grupo electroatractor na posição 3 com rendimentos razoáveis. Foram obtidos os compostos 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona, 4-metil-7-(fenilamino)- 2*H*-cromen-2-ona, 3-bromo-7-(4-metoxi-fenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona e 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)- 2*H*-cromen-2-ona. Os espectros de absorção destes quatro cromóforos apresentaram c.d.o. máximos desviados para a zona do vermelho.

Para a expansão do sistema π pela introdução de um grupo etinileno como ponte conjugada na posição 3 foi necessário a activação desta posição. Para tal, procedeu-se à bromação da *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida seguida da reacção de Sonogashira-Hagihara com o

álcool propáglico. A oxidação posterior ao aldeído formou a *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)2H-cromen-7-il)octanamida.

Numa aproximação convergente foi testada a síntese do ácido 2-cianopent-2-en-4-óico (sem sucesso) para posterior reacção de Sonogashira-Hagihara com 3-bromo-*N*-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida.

Palavras-chave Parte I

Solanum cernuum Vell.; 31-Norcicloartanonas; Cernumidinas; Actividade anti-inflamatória; Actividade anti-neoplásica

Palavras-chave Parte II

Corantes; sensibilizadores; Cumarinas; Cromóforos; Reacção de Buchwald-Hartwig; Reacção de Sonogashira-Hagihara

ABSTRACT

The first part focused on the research of new bioactive constituents from *Solanum cernuum* Vell.

Three triterpenoids with a 31-norcycloartanone structure ((+)-cycloeucalenone, (+)-24-oxo-31-norcycloartanone and (+)-24(1,3-dioxiethane)-31-norcycloartanone) and four new alkaloids (cernumidine, isocernumidine, cernumidine B and isocernumidine B) with a (2-aminopyrrolidin-1-yl)carboxamide unit condensed in amide form with *E* or *Z* isoferulic acids were isolated for the first time from *Solanum* genus.

(+)-24-Oxo-31-norcycloartanone has selective activity against lung tumor cell line (NCIH460) and decreases significantly COX-2 protein expression. (+)-24(1,3-dioxiethane)-31-norcycloartanone) was also active against leukemia cell line K562. Cernumidine displayed inhibition of interleukin-8 production by HT-29 colon carcinoma cells.

The known phenolic compounds quercitrin, afzelin, hyperin, ferulic acid and *N*-acetyldopamine were also identified.

In the second part, with the aim of synthesizing new chromophores based on 7-amino-4-methyl-2*H*-chromen-2-one, a protocol developed for the Buchwald-Hartwig C-N cross-coupling reaction allowed the introduction of electron-donating groups at the 7-position as also the introduction of electron-withdrawing substituents at the 3-position with reasonable yields.

Four new derivatives [7-(4-methoxyphenylamino)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one, 4-methyl-7-(phenylamino)-2*H*-chromen-2-one, 3-bromo-7-(4-methoxyphenylamino)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one and 3-bromo-4-methyl-7-(phenylamino)-2*H*-chromen-2-one]] were obtained with red-shifted UV-Vis absorption spectra.

In order to introduce an ethynylene group at the 3-position of the scaffold which extended the π system, it was necessary to activate this position by bromination of *N*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)octanamide, followed by Sonogashira-Hagihara cross-coupling reaction with propargylic acid and oxidation to afford *N*-(4-methyl-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-ynyl)2*H*-chromen-7-yl)octanamide.

In a convergent approach for further Sonogashira-Hagihara cross-coupling reaction of 3-bromo-*N*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)octanamide, the synthesis of 2-cyanopent-2-en-4-óic acid was unsuccessfully assayed.

Key words Parte I

Solanum cernuum Vell.; 31-Norcycloartanones; Cernumidines; anti-inflammatory activity; anti-neoplastic activity

Key words Parte II

Dyes; coumarins; Chromophores; Buchwald-Hartwig reaction; Sonogashira-Hagihara reaction.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	vii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
Índice Geral	xv
Índice de Figuras	xxi
Índice de Tabelas	xxv
Índice de Esquemas	xxix
Índice de Estruturas	xxxii
Índice de Abreviaturas	xl
PARTE I Estudo Fitoquímico de <i>Solanum cernuum</i> Vell.	1
CAPÍTULO I.1 INTRODUÇÃO	3
I.1.1 Género <i>Solanum</i>	5
I.1.2 <i>Solanum cernuum</i>	5
I.1.3 Inflamação e cancro	7
I.1.3.1 Função das espécies reactivas de oxigénio e azoto	9
I.1.3.2 Função dos mediadores pro-inflamatórios	11
I.1.3.3 NF-kB	11
I.1.3.4 Citoquinas	12
I.1.3.5 Sirtuína 1	13
I.1.3.6 Interleuquina-8	13
I.1.3.7 Moléculas da via das prostaglandinas	13
I.1.4 Doenças Bacterianas	16
I.1.5 Terpenóides da série cicloartano	17
I.1.5.1 Estrutura	17
I.1.5.2 Biossíntese dos triterpenos	21

I.1.5.3 Actividade Biológica	25
I.1.6 Amidas dos ácidos hidroxicinâmicos	26
I.1.6.1 Estrutura	27
I.1.6.2 Biossíntese das HCAAs	30
I.1.6.3 Actividade Biológica	31
I.1.7 Glicoalcalóides esteroidais	34
I.1.8 Outros alcalóides	39
I.1.9 Flavonóides	41
I.1.9.1 Estrutura	41
I.1.9.2 Biossíntese	43
I.1.9.3 Actividade Biológica	45
CAPÍTULO I.2 DISCUSSÃO DE RESULTADOS – Estudo fitoquímico	47
I.2.1 Introdução	49
I.2.2 Extracção	50
I.2.3 Avaliação da actividade biológica dos extractos EBD e EBE	50
I.2.3.1 Avaliação da actividade anti-inflamatória	51
I.2.3.2 Avaliação da actividade anti-ulcerosa	53
I.2.3.3 Avaliação da actividade antibacteriana	55
I.2.4 Fraccionamento dos extractos EBD e EBE	56
I.2.5 Elucidação Estrutural	56
I.2.5.1 Elucidação estrutural dos triterpenos	56
(+)-Cicloeucalenona (24)	57
(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107)	61
(+)-24-(1,3-dioxetan-2-il)-31-norcicloartanona (108)	64
I.2.5.2 Elucidação estrutural das amidas dos ácidos hidroxicinâmicos	67
Cernumidina (109)	67
Isocernumidina (110)	74
Cernumidina B (111)	77
Isocernumidina B (112)	79
Hipótese biossintética	80
I.2.5.3 Elucidação estrutural dos compostos fenólicos	82

Quercitrina (1)	82
Afzelina (2)	85
Hiperina (113)	86
Ácido ferúlico (114)	87
N-acetildopamina (115)	89
CAPÍTULO I.3 DISCUSSÃO DE RESULTADOS – Actividade biológica	93
I.3.1 Actividade anti-inflamatória	95
I.3.1.1 Modelo de contorção induzida por ácido acético	95
I.3.1.2 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina	96
I.3.2 Actividade para moléculas alvo pertencentes à rede de sinalização	98
I.3.2.1 Expressão de COX-2	98
I.3.2.2 Actividade da Sirtuína 1	99
I.3.2.3 Produção da citocina TNF-α	100
I.3.2.4 Interleuquina-8	101
I.3.2.5 Actividade anti-neoplásica	102
I.3.2.6 Testes de toxicidade aguda	105
I.3.2.7 Actividade antibacteriana	106
CONCLUSÕES	107
CAPÍTULO I.4 PARTE EXPERIMENTAL	1111
I.4.1. Equipamento e condições experimentais	113
I.4.2. Métodos cromatográficos	114
I.4.3. Determinação estrutural	115
I.4.3.1 Material vegetal	115
I.4.3.2 Extracção	115
I.4.3.3 Isolamento dos Metabolitos Estudados	116
(+)-Cicloeucalenona (24)	116
(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107)	117
(+)-24-(1,3-dioxetan-2-il)-31-norcicloartanona (108)	118
Cernumidina (109)	120
Isocernumidina (110)	122

Cernumidina B (111)	122
Isocernumidina B (112)	123
Quercitrina (1)	124
Afzelina (2)	125
Hiperina (113)	125
Ácido ferúlico (114)	126
N-acetildopamina (115)	127
I.4.4 Anexo 1- Ensaios de actividade biológica	128
I.4.4.1 Actividade antibacteriana	128
I.4.4.2 Actividade anti-neoplásica	129
I.4.4.3 Produção da citocina TNF- α em células de macrófagos diferenciados THP-1	129
I.4.4.4 Expressão da COX-2 em células diferenciadas THP-1	130
I.4.4.5 Actividade da Sirtuína 1 (SIRT1)	130
I.4.4.6 Efeitos inibidores na produção de interleucina 8 (IL-8) em células HT-29	131
I.4.4.7 Ensaio de edema de orelha	131
I.4.4.8 Ensaios de contorção induzida por ácido acético	132
I.4.4.9 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina	133
I.4.4.10 Actividade anti-ulcerosa	133
I.4.4.11 Toxicidade Aguda	134
I.4.4.12 Análise Estatística	134
I.5 REFERÊNCIAS	135
 PARTE II Síntese de cromóforos derivados de cumarinas possíveis aplicações em dispositivos fotovoltaicos	149
 CAPÍTULO II.1 INTRODUÇÃO	151
II.1.1 Células solares sensibilizadas por corante (DSCs)	153
II.1.2 Complexos de ruténio	158
II.1.3 Corantes Orgânicos	165
II.1.4 Corantes derivados de cumarinas	169
II.1.4.1. Efeito da variação da ponte conjugada π	171

II.1.4.2 Efeito da variação do grupo aceitador	174
II.1.4.3 Efeito da variação do grupo dador	176
II.1.4.4. Medidas de FT-IR e análise de estudos de cálculos da estrutura do corante NKX-2311 (1)	178
II.1.5 A formação de ligações C _{sp} ² -N e C _{sp} ² -C _{sp} por catálise de paládio	179
II.1.5.1 Síntese de aminas aromáticas catalizada por paládio	179
II.1.5.2 Reacção de Buchwald-Hartwig em cumarinas	188
II.1.5.3 Acoplamento de Sonogashira-Hagihara	190
II.1.5.4 Acoplamento de Sonogashira-Hagihara em cumarinas	193
CAPÍTULO II.2 DISCUSSÃO DE RESULTADOS	197
II.2.1 Introdução de um grupo electrodoador adicional no grupo amina da posição 7	200
II.2.1.1 Síntese de 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (44) e de 4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (45)	200
II.2.2. Introdução de dois grupos electrodoadores adicionais no grupo amina na posição 7	205
II.2.2.1 Estratégia de síntese de 7-(bis(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (46)	205
II.2.2.2. Estratégia de síntese de 7-((4-metoxifenil)(octil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (49)	206
II.2.2.3. Estratégia de síntese de 7-(hexil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (51)	211
II.2.3. Introdução de um grupo electrodoador adicional no grupo amina da posição 7 e de um grupo electroatractor na posição 3	212
II.2.3.1. Síntese de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (52) e de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (53)	212
II.2.4. Introdução de dois grupos electrodoadores adicionais na posição 7 e de um grupo electroatractor na posição 3	219
II.2.4.1. Estratégia de síntese de 3-bromo-7-(decil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (56)	219
II.2.5 Sínteses preliminares	220
II.2.5.1 Síntese de N-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (57)	220
II.2.5.2 Síntese de N-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2H-cromen-7-il)octanamida (58)	224
II.2.5.3 Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-ciano-5-(7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)pent-2-en-4-inóico (59)	227

II.2.5.4 Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-cianopent-2-en-4-ínico (61)	227
II.2.6 Efeito da variação de grupos electrodoadores e electroatractores nos espectros de absorção dos derivados de cumarinas 44, 45, 52 e 53	230
II.2.7 CONCLUSÕES	234
CAPÍTULO II.3 PARTE EXPERIMENTAL	239
II.3.1 Equipamento e condições experimentais	241
II.3.2 Síntese de 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (44) e de 4-metil-7-(fenilamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (45)	242
II.3.3 Reacção de arilação de 7-(4-metoxifenil)amino)-3-bromo-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (44)	244
II.3.4. Síntese de <i>N</i> -(4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (47)	245
II.3.5. Reacções de redução de <i>N</i> -(4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (47) a 4-metil-7-(octilamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (48)	246
II.3.6 Reacção de aminação redutiva de 7-amino-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (43)	247
II.3.7 Síntese de <i>N</i> -(3-bromo-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (55)	248
II.3.8 Preparação de 7-amino-3-bromo-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (54)	249
II.3.9 Preparação de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (52) e de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (53)	250
II.3.10 Reacção de alquilação de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (52)	254
II.3.11. Preparação de <i>N</i> -(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (57)	254
II.3.12 Preparação de <i>N</i> -(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (58)	256
II.3.13 Reacção de hidrólise de <i>N</i> -(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (58)	257
II.3.14 Tentativa de síntese de ácido (Z)-2-cianopent-2-en-4-óico (61)	258
II.4 REFERÊNCIAS	259
ANEXO- Artigos publicados	271

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS		Páginas
Figura I.1.1	<i>Solanum cernuum</i> Vell.	6
Figura I.1.2	Função da inflamação na promoção do tumor. ²⁹	8
Figura I.1.3	Biossíntese do difosfato de farnesilo (FPP).	22
Figura I.1.4	Biossíntese do esqualeno.	23
Figura I.1.5	Biossíntese de cicloartenol.	24
Figura I.1.6	Biossíntese das HCAAs	30A
Figura I.1.7	Biossíntese da quercetina (97).	44
Figura I.2.1	Efeito do tratamento com extracto etanólico e de diclorometano de <i>Solanum cernuum</i> Vell no ensaio do edema de orelha induzido em ratos por óleo de croton a 2,5%.	51
Figura I.2.2	Efeito do tratamento com o extracto etanólico, o extracto de diclorometano de <i>Solanum cernuum</i> Vell no ensaio de contorção abdominal induzida em ratos pelo ácido acético a 0,8%.	52
Figura I.2.3	Índice de lesões ulcerosas ULI obtidas com diferentes doses de extracto de diclorometano de <i>Solanum cernuum</i> (solução salina, 0.9% NaCl) e carbenoxolona (200mg/Kg) no modelo de etanol.	54
Figura I.2.4	Índice de lesões ulcerosas ULI obtidos com o extracto de diclorometano de <i>Solanum cernuum</i> Vell. (solução salina, 0.9% NaCl) e cimetidina (200mg/Kg) no modelo de indometacina.	54
Figura I.2.5	Correlações de HMBC observadas para a (+)-cicloeucalenona (24).	60
Figura I.2.6	Mecanismo de ruptura do cetol.	64
Figura I.2.7	Espectro de ¹ H RMN da cernumidina (109) em CD ₃ OD.	68
Figura I.2.8	Excerto do espectro de HMBC da cernumidina (109) em CD ₃ OD.	69

FIGURAS		Páginas
Figura I.2.9	Experiências de desacoplamento realizadas no espectro de ^1H RMN da cernumidina (109) em $\text{DMSO}-d_6$.	72
Figura I.2.10	Estrutura cristalina de Raios X da cernumidina (109).	73
Figura I.2.11	Abertura do anel da pirrolidina em meio ácido.	74
Figura I.2.12	Proposta de formação das cernumidinas.	81
Figura I.3.1	Efeito da (+)-cicloeucalenona (24) e da (+)-24-oxo-31-nor-cicloartanona (107) no edema da pata induzido por carragenina expresso como edema da pata (mL) em função do tempo (horas) após indução da inflamação.	97
Figura I.3.2	Efeito da (+)-cicloeucalenona (24) e da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107) na expressão proteica da COX-2 em células estimuladas THP-1.	98
Figura I.3.3	Efeito dos diferentes controles utilizados na actividade SIRT1 (%).	99
Figura I.3.4	Efeito da (+)-cicloeucalenona (A), (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (B) e da cernumidina (C) na actividade da sirtuína 1 (SIRT1) (%) nas concentrações indicadas.	100
Figura I.3.5	Efeito inibidor da cernumidina (109) na produção de interleucina 8 (IL8) pelas células HT-29.	101
Figura I.3.6	Percentagem de crescimento das linhas de células na presença de diferentes concentrações de soluções de (+)-cicloeucalenona (24).	102
Figura I.3.7	Percentagem de crescimento das linhas de células na presença de diferentes concentrações de soluções de (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107).	103

FIGURAS		Páginas
Figura I.3.8	Percentagem de crescimento das linhas de células na presença de diferentes concentrações de soluções de (+)-24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (108).	103
Figura I.3.9	Percentagem de crescimento das linhas de células na presença de diferentes concentrações de soluções de cernumidina (109).	105
Figura II.1.1	Princípios de operação e níveis de energia de uma DSC S, S ⁺ , S* representam o sensibilizador nos estados fundamental, oxidado e excitado, respectivamente; R/R [•] representa o mediador redox; CB denota a banda de condução. ³	154
Figura II.1.2	Diagrama de energias esquemático para uma DSC baseada no corante NKX-2311 (1), um electrodo de TiO ₂ nanocristalino, e um electrólito I ⁻ /I ₃ ⁻ . Os potenciais de oxidação (E _{ox}) e E _{ox} -E ₀₋₀ para NKX-2311 são usados como os níveis de energia para a HOMO e a LUMO, respectivamente. ⁶	156
Figura II.1.3	Cinética das reacções numa DSC. Adaptado de (Pagliaro & Palmisano, 2008). ⁸	157
Figura II.1.4	Esquema da estrutura dos sensibilizadores orgânicos. ²	165
Figura II.1.5	Transferência de carga intramolecular (ICT) que ocorre na 7-dimetilaminocumarina (12) via absorção e emissão de luz. ⁵²	169
Figura II.1.6	Estrutura e HOMO e LUMO do sal de potássio do corante 1 optimizados ao nível B3LYP/3-21G*. ⁶	178
Figura II.2.1	Mecanismo da reacção de acilação.	210
Figura II.2.2	Mecanismo da clivagem reductiva da amida. ¹⁰⁸	211
Figura II.2.3	Mecanismo da reacção de bromação.	214
Figura II.2.4	Mecanismo da reacção de oxidação.	226
Figura II.2.5	Mecanismo da oxidação de Swern.	228

FIGURAS		Páginas
Figura II.2.6	Mecanismo da condensação de Knoevenagel.	229
Figura II.2.7	Mecanismo da adição de Michael.	229
Figura II.2.8	Direcção da transferência de carga nas cumarinas	232
Figura II.2.9	Espectros de absorção normalizados ao comprimento de onda máximo de absorção da 7-amino-4-metil-cumarina (43), da 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (45) e da 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (53) em etanol.	232
Figura II.2.10	Espectros de absorção normalizados ao comprimento de onda máximo de absorção da 7-amino-4-metil-cumarina (43), da 7-(4-metoxifenilamino)-cumarina (44) e da 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (52) em etanol.	233

ÍNDICE DE TABELAS

TABELAS		Páginas
Tabela I.2.1	Valores da concentração bactericida mínima (mgmL ⁻¹) do extracto de diclorometano (EBD) e do extracto etanólico (EBE) de <i>Solanum cernuum</i> Vell. para diferentes bactérias.	55
Tabela I.2.2	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a (+)-cicloeucalenona (24) (CDCl ₃), correlações COSY ¹ H - ¹ H e HMBC.	59
Tabela I.2.3	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a 4α-(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107) (CDCl ₃) e correlações HMBC.	63
Tabela I.2.4	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a (+)-(+)-24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (108) (CDCl ₃) e correlações HMBC.	66
Tabela I.2.5	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a cernumidina (109) (CD ₃ OD e DMSO- <i>d</i> ₆), correlações COSY ¹ H - ¹ H e HMBC.	70
Tabela I.2.6	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a isocernumidina (110) (CD ₃ OD), correlações COSY ¹ H - ¹ H e HMBC.	76
Tabela I.2.7	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a cernumidina B (111) (CD ₃ OD).	78
Tabela I.2.8	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz) para a quercitrina (1), para a afzelina (2) e para a hiperina (123) (CD ₃ OD).	83

TABELAS		Páginas
Tabela I.2.9	Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para o ácido ferulico (114) (CD_3OD).	88
Tabela I.2.10	Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a <i>N</i> -acetildopamina (115) (CD_3OD) e correlações HMBC.	89
Tabela I.3.1	Efeito do extracto de diclorometano das folhas de <i>S. cernuum</i> Vell. (DCE), da (+)-cicloeucalenona (24), da (+)-24-oxo-31-nor-cicloartanona (107) e metamizole na contorção induzida por ácido acético.	95
Tabela I.3.2	Efeitos das soluções de (+)-cicloeucalenona (24) ($50\ \mu\text{g mL}^{-1}$), (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107) ($15\ \mu\text{g mL}^{-1}$) e da cernumidina (109) ($50\ \mu\text{g mL}^{-1}$) na produção da citoquina $\text{TNF-}\alpha$ (pg mL^{-1}).	101
Tabela I.3.3	Resultados da acção da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107) e da (+)-24-(1,3-dioxietano)-31-norcicloartanona (108) para as linhas celulares humanas ($\mu\text{g/mL}$).	104
Tabela II.1.1	Efeito da variação da ponte conjugada (π), por aumento do número de ligações duplas, na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.	172
Tabela II.1.2	Efeito da variação da ponte conjugada (π) por introdução de fragmentos com anéis aromáticos na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.	173

TABELAS		Páginas
Tabela II.1.3	Efeito da variação do grupo aceitador (A) na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.	175
Tabela II.1.4	Efeito da variação do grupo aceitador (A) por introdução de fragmentos heterocíclicos catiónicos na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.	176
Tabela II.1.5	Efeito da variação do grupo dador (D) na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.	177
Tabela II.2.1	Reacções de Buchwald-Hartwig da 7-amino-4-metilcumarina (43) com 4-iodoanisole usando diferentes condições reaccionais.	201
Tabela II.2.2	Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (filme) e de MS (EI+) para 7-(metoxifenilamino)-4-metilcumarina (44) e para a 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (45).	204
Tabela II.2.3	Reacções de Buchwald-Hartwig da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (44) com 4-iodoanisole variando a natureza do catalisador, o volume de solvente e o tempo da reacção.	206
Tabela II.2.4	Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (KBr) e de MS (EI+) para a <i>N</i> -(4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (47).	208

TABELAS		Páginas
Tabela II.2.5	Reacções de acoplamento da 7-amino-3-bromo-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (54) com 4-iodoanisole utilizando diferentes condições reaccionais.	216
Tabela II.2.6	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz), de IV (filme) e de MS (EI+) para 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (52) e para a 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (53).	218
Tabela II.2.7	Reacções de acoplamento de Sonogashira-Hagihara da <i>N</i> -(3-bromo-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (55) com prop-2-in-1-ol utilizando diferentes condições reaccionais.	221
Tabela II.2.8	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz), de IV (filme) e de MS (EI+) para a <i>N</i> -(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (57).	223
Tabela II.2.9	Dados de ¹ H RMN (400 MHz) e de ¹³ C RMN (100 MHz), de IV (KBr) e de MS (EI+) para a <i>N</i> -(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida (58).	225
Tabela II.2.10	Efeito da introdução de grupos electrodoadores e electroatractores nos espectros de absorção dos derivados de cumarinas em etanol.	231

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMAS		Páginas
Esquema II.1.1	Síntese de amins aromáticas catalizada por paládio a partir de brometos de arilo e amidas de estanho. ⁷⁰	181
Esquema II.1.2	Síntese de lavendamicina catalizada por paládio. ⁷¹	181
Esquema II.1.3	Síntese de amins aromáticas por reacção de halogenetos de arilo com amidas de estanho geradas <i>in situ</i> . ⁷²	182
Esquema II.1.4	Síntese de amins aromáticas catalizada por paládio em presença de <i>ter</i> -butóxido de sódio. ⁷³	182
Esquema II.1.5	Síntese de amins aromáticas terciárias a partir da piperidina, catalizada por paládio em presença de hexametil disililazida de lítio $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$. ⁷⁴	182
Esquema II.1.6	Síntese de amins aromáticas a partir de iodetos de arilo catalizada pelo sistema catalítico $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ e $\text{P}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{Me})_3$ em presença de <i>ter</i> -butóxido de sódio	183
Esquema II.1.7	Síntese de amins aromáticas a partir de anilinas em presença de um complexo catalítico de “segunda geração”. ⁶⁵	184
Esquema II.1.8	Síntese de alquilarilaminas em presença de um complexo catalítico de “segunda geração”.	185
Esquema II.1.9	Isomerização <i>trans-cis</i> no complexo catalítico.	186
Esquema II.1.10	Ciclo catalítico proposto por Buchwald-Hartwig. ⁸⁶	188

ESQUEMAS		Páginas
Esquema II.1.11	Síntese de 3-amino-4- <i>aryl</i> -cumarina (37) a partir de 3-bromo-4- <i>aryl</i> -cumarina (38) e <i>p</i> -anisidina na presença do sistema catalítico Pd ₂ (dba) ₃ /Xantphos. ⁸⁷	189
Esquema II.1.12	Método geral de síntese de 3-aminocumarinas na presença do sistema catalítico Pd ₂ (dba) ₃ /Xantphos.	189
Esquema II.1.13	Reacção de Sonogashira co-catalizada com cobre. ⁹⁰	190
Esquema II.1.14	Ciclo catalítico da reacção de Sonogashira co-catalizada com o cobre. ⁹¹	191
Esquema II.1.15	Acoplamento de Sonogashira da 3-bromo-cumarina (40) e do 2-metilbut-3- <i>in</i> -2-ol co-catalizado pelo cobre.	193
Esquema II.1.16	Acoplamento de Sonogashira da 4-tosilcumarina (41) com acetilenos com diferentes substituintes em presença do sistema catalítico constituído por PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ e iodeto de cobre. ¹⁰⁰	194
Esquema II.1.17	Estudo do acoplamento de Sonogashira co-catalizado com cobre partindo da 3-bromocumarina com acetilenos com diferentes substituintes. ¹⁰¹	195
Esquema II.1.18	Estudo do acoplamento de Sonogashira co-catalizado com cobre partindo da 3-bromocumarina com grupos funcionais adicionais com acetilenos com diferentes substituintes.	196
Esquema II.2.1	Estratégia de síntese de 7-((4-metoxifenil)(octil)amino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (49).	207
Esquema II.2.2	Estratégia de síntese de 7-(hexil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (51).	212

ESQUEMAS		Páginas
Esquema II.2.3	Estratégia de síntese de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (52).	212
Esquema II.2.4	Estratégia alternativa de síntese de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (52).	213
Esquema II.2.5	Estratégia de síntese de 3-bromo-7-(decil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (56).	220
Esquema II.2.6	Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-ciano-5-(7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)pent-2-en-4-inóico (59).	227
Esquema II.2.7	Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-cianopent-2-en-4-inóico (61).	228
Esquema II.2.8	Resumo das reacções realizadas	235

ÍNDICE DE ESTRUTURAS PARTE I

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
1	Quercitrina	7
2	Afzelina	7
3	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG)	10
4	8-Nitroguanina	10
5	Malondialdeído-desoxiguanosina	11
6	3,N ⁴ -etenodesoxicitidina	11
7	3,N ⁶ -etenodesoxiadenosina	11
8	EGCG	16
9	Curcumina	16
10	Resveratrol	16
11	Capsaicina	16
12	9 β ,19-Ciclo-5 α -lanostano (cicloartano)	18
13	4 α -Monometil cicloartano	18
14	4,4-Demetil cicloartano	18
15	Cicloartenol	19
16	Cicloartenona	19
17	Acteína	19
18	24-Metilenocicloartenil <i>p</i> -hidroxicinamato	20
19	Cicloasgenina C	20
20	24-Metoxi-24-metilcicloartanol	20
21	Ciclosieveriosido F	25

ESTRUTURA	Nº	Páginas
22	Ciclomargenol	26
23	Cicloeucaleanol	26
24	Cicloeucalenona	26
25	Putrescina	27
26	Espermidina	27
27	Espermina	27
28	Agmatina	27
29	<i>p</i> -Cumaroilputrescina	27
30	Feruloilputrescina	27
31	<i>p</i> -Cumaroilagmatina	27
32	Feruloilagmatina	27
33	<i>N</i> -cafeoilputrescina	27
34	<i>N,N</i> -dicafeolespermidina	27
35	Tiramina	28
36	Octopamina	28
37	Dopamina	28
38	Triptamina	28
39	<i>N-trans-p</i> -cumaroiltiramina	28
40	<i>N-trans</i> -feruloiltiramina	28
41	<i>N-trans-p</i> -cumaroiloctopamina	28
42	<i>N-trans</i> -feruloiloctopamina	28
43	<i>N-cis-p</i> -cumaroiloctopamina	28
44	<i>N-cis</i> -feruloiloctopamina	28

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
45	<i>N-trans-p-cumaroildopamina</i>	28
46	<i>N-trans-feruloildopamina</i>	28
47	<i>N-trans-grossamida</i>	29
48	<i>N-cis-grossamida</i>	30
49	<i>p-cumaroil CoA</i>	30
50	Cafeoil CoA	30
51	Feruloil CoA	30
52	Ácido <i>trans</i> -cinâmico	30
53	L-fenilalanina	30
54	Ácido <i>p</i> -cumárico	30
55	Tirosina	30
56	Ácido cafeico	30
57	Ácido ferúlico	30
58	L-ornitina	30
59	L-arginina	30
60	N-carbamoilputrescina	30
61	Triptofano	31
62	<i>N</i> -cinamoil- <i>trans</i> -3-aminometilglaucina	33
63	<i>N</i> -feruloil- <i>trans</i> -3-aminometilglaucina	33
64	<i>N</i> -sinapoil- <i>trans</i> -3-aminometilglaucina	33
65	<i>N-o-cumaroil-trans</i> -3-aminometilglaucina	33
66	<i>N-p-cumaroil-trans</i> -3-aminometilglaucina	33
67	<i>p</i> -Dicumaroilputrescina	33
68	Diferuloilputrescina	33

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
69	Solasodina	34
70	Solacongestidina	34
71	Solanidina	34
72	Solanocapsina	34
73	Jurubidina	34
74	Cacotriose	35
75	Solatriose	35
76	Comertetraose	35
77	Licotetraose	35
78	α -Solanina	36
79	α -Caconina	37
80	Leptina I	37
81	Leptnina II	36
82	Solapalmitina	39
83	Solapalmitidina	39
84	Solamina	39
85	Solacaproina	39
86	Solauretina	39
87	Higrina	40
88	Cusco-higrina	40
89	Cocaína	40
90	Hiosciamina	40
91	Calistegenina A ₃	40

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
92	Calistegenina B ₂	40
93	Solsodomina A	41
94	Solsodomina B	41
95	Apigenina	42
96	Luteolina	42
97	Quercetina	42
98	Canferol	42
99	Naringenina	42
100	Hesperitina	42
101	Epicatequina	42
102	Galocatequina	42
103	Cianidina	42
104	Pelargonidina	42
105	Genisteína	42
106	Daidezina	42
107	24-Oxo-31-norcicloartanona	56
108	24-(1,3-Dioxietano)-31-norcicloartanona	56
109	Cernumidina	67
110	Isocernumidina	67
111	Cernumidina B	67
112	Isocernumidina B	67
113	Hiperina	82
114	Ácido ferúlico	82
115	<i>N</i> -acetildopamina	89

ÍNDICE DE ESTRUTURAS PARTE II

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
1	NKX-2311	156
2	Corante N ₃	159
3	Corante N719	159
4	Corante negro	160
5	Corante Z-907	161
6	Corante Z-910	162
7	Corante BTC-2	163
8	YD2- <i>o</i> -C8	164
9	Corante C217	167
10	Corante D205	168
11	Cumarina	169
12	7-Dimetilaminocumarina	169
13	Cumarina C ₃₄₃	170
14	NKX-2398	171
15	NKX-2388	171
16	NKX-2586	171
17	NKX-2753	172
18	NKX-2593	173
19	NKX-2587	173
20	NKX-2677	173
21	NKX-2697	173
22	NKX-2700	173

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
23	HKK-CM1	173
24	NKX-2807	174
25	NKX-2883	174
26	NKX-2460	175
27	NKX-2475	175
28	NKX-2195	176
29	NKX-2510	176
30	JK-35	177
31	SD-2	177
32	Lavendamicina	181
33	DPPF	183
34	BINAP	183
35	<i>Bite angle</i> β_n	184
36	Xantphos	186
37	3-amino-4-aril-cumarina	189
38	3-bromo-4-aril-cumarina	189
39	3-(3-hidroxi-3-metilbut-1-inil)-cumarina	193
40	3-bromo-cumarina	193
41	4-tosil-cumarina	194
42	3-feniletinil-7-aminocumarina	196
43	Cumarina 120 (7-amino-4-metil-cumarina)	196
44	7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona	200
45	4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona	201

ESTRUTURA Nº	NOME	Páginas
46	7-(bis(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	205
47	<i>N</i> -4-(metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida	207
48	4-metil-7-(octilamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	207
49	7-((4-metoxifenil)(octilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	207
50	7-(hexilamina)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	212
51	(7-(hexil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	212
52	3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	212
53	3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	213
54	7-amino-3-bromo-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	213
55	<i>N</i> -(3-bromo-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida	213
56	3-bromo-7-decil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	220
57	<i>N</i> -(3-(3-hidroxi- <i>prop</i> -1-inil)-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida	221
58	<i>N</i> -(4-metil-2-oxo-3-(3-oxo- <i>prop</i> -1-inil)-2 <i>H</i> -cromen-7-il)octanamida	224
59	(<i>Z</i>)-2-ciano-5-(7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)pent-2-en-4-inóico	227
60	3-(7-amino-4-metil-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-3-il)propionaldeído	227
61	Ácido (<i>Z</i>)-2-cianopent-2-en-4-inóico	227
62	Ácido 2-ciano-3-hidroxi- <i>pent</i> -4-inóico	229
63	(<i>E</i>)-3-(piperidin-1-il)acriladeído	230

LISTA DE ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^t$	Rotação óptica específica em graus, à temperatura t, na risca D do espectro de emissão de sódio
AcOEt	acetato de etilo
ASW	‘artificial sea water’
c.c.f.	cromatografia em camada fina
COSY	‘correlation spectroscopy’
^{13}C RMN	ressonância magnética nuclear de carbono
c.d.o	comprimento de onda
δ	desvio químico em ppm
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplete duplo
<i>dl</i>	duplete largo
<i>dt</i>	duplete de tripletos
<i>tl</i>	tripleto de heptetos
DEPT	‘distortionless enhancement by polarization transfer’
DMSO	sulfóxido de dimetilo
EM	extracto metanólico
EI/MS	espectrometria de massa de impacto electrónico
ESI/MS	espectrometria de massa com ionização por electropulverização
eV	electrão Volt
^1H RMN	ressonância magnética nuclear de protão
^{13}C RMN	ressonância magnética nuclear de carbono
HMBC	‘heteronuclear multiple bond correlation’
HMQC	‘heteronuclear multiple quantum correlation’
HPLC	‘high performance liquid chromatography’
Hz	hertz
IV	espectroscopia de infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hz
LC/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LD ₅₀	Dose letal a 50%
λ	comprimento de onda
<i>m</i>	multipleteo
<i>m/z</i>	razão massa/carga em u.m.a.
MeOH	metanol
MRSA	estirpe de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
MHz	megahertz
ν	número de onda em cm ⁻¹
NH ₄ OAc	acetato de amónia
nm	nanómetro
OD ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
ppm	partes por milhão
<i>s</i>	singuleto
<i>s/</i>	singuleto largo
<i>T/</i>	triplete de heptetos
TFA	ácido trifluoracético
TMS	tetrametilsilano
u.m.a	unidades de massa atómica
UV	espectroscopia de ultravioleta
V/V	volume/volume

PARTE I

Estudo de fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell.

Capítulo I.1

Estudo de fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell.

INTRODUÇÃO

I.1.1 Género *Solanum*

O género *Solanum* constitui um dos grandes géneros no reino das plantas, contendo aproximadamente 1500 espécies. É o género mais importante da família das *Solanaceae*. As plantas deste género diferenciam-se das restantes por possuírem anteras que abrem por poros terminais e flores que não possuem um cálice especializado.¹

As espécies do género *Solanum* ocorrem em todos os continentes com clima temperado e tropical² e apresentam uma enorme diversidade morfológica e ecológica.¹ Pode afirmar-se que é o género vegetal economicamente mais importante incluindo espécies cultivadas muito comuns tais como o tomate (*S. lycopersicum*), a batata (*S. tuberosum*) e a beringela (*S. melongena*), plantas alimentares de menor importância e espécies com metabolitos secundários venenosos ou úteis do ponto de vista medicinal.¹ Algumas plantas das *Solanaceae* têm sido usadas na medicina tradicional para tratar o cancro desde há muito e têm sido adoptadas como suplemento alimentar para prevenir o cancro na região do sul da China.³ Devido às suas propriedades nutricionais as plantas do género *Solanum* são, muitas vezes, incluídas na composição das medicações fitoterapêuticas.^{4,5}

Estudos na área da química dos produtos naturais demonstraram que este género era uma fonte rica em metabolitos secundários com importante actividade biológica desde glicosídeos, alcalóides esteroidais e saponinas^{6,7,8} que ocorrem geralmente na forma glicosilada,⁹ e de isoprenóides análogos que não possuem azoto na sua estrutura e apresentam um grande potencial para a indústria de esteróides. Foi também relatada a presença de outros compostos azotados desde betaínas a alcalóides de estrutura complexa.¹⁰

I.1.2 *Solanum cernuum*

A espécie *Solanum cernuum* Vell., comumente designada por panacéia e braço de preguiça, é uma planta brasileira nativa principalmente nos estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais e descrita como a “sempre florida”. Trata-se de um arbusto erecto de 2-3 metros de altura, perene e pouco ramificado, com pêlos longos e pardacentos. As folhas são simples, inteiras, subcoriáceas,

longo-pecioladas, pubescentes na face inferior, de 20-35 cm de comprimento. As flores são amareladas ou esbranquiçadas, dispostas em pequenas cimeiras nas axilas foliares. Os frutos são bagas globosas, pequenas de cor amarela quando maduras.¹¹



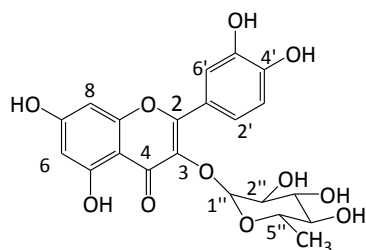
Figura I.1.1 *Solanum cernuum* Vell.

(extraído de : <http://www.flickr.com/photos/mariasg/541468053> 16-02-2014)

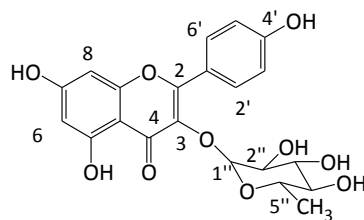
O uso da planta *Solanum cernuum* Vell. assumiu particular importância na medicina tradicional brasileira. Assim, as infusões das partes aéreas são utilizadas no tratamento de úlceras gástricas, de distúrbios hepáticos, infecções de pele, como agentes antitumorais, depurativos, diuréticos e anti-blenorreicos.^{12,13} As raízes, usadas como infusões ou decocções, possuem actividade anti-hemorrágica.¹² As infusões das folhas são usadas para problemas cardíacos devido à sua acção tranquilizante enquanto que usadas como decocções servem para tratar distúrbios uterinos, reumatismo, afecções na uretra e vesícula.¹¹ Apesar da utilização generalizada desta planta na medicina tradicional brasileira, não está referenciada na Farmacopeia brasileira.

Foi realizado um estudo de avaliação da actividade anti-ulcerosa de um extracto hidro-alcoólico das partes aéreas de *Solanum cernuum* Vell. utilizando o modelo de úlcera induzida pela indometacina, tendo sido observada uma actividade significativa.¹³ Foi também descrita a composição rica em carbo-hidratos no cálix de rebentos¹⁴ e foram identificados dois flavonóides glicosilados, quercitrina (**1**) e afzelina (**2**) de extractos de folhas de *S. cernuum* como marcadores micromoleculares.¹⁵

Considerando o potencial terapêutico do género, o estudo químico e farmacológico de *S. cernuum* permanece uma área ainda por explorar.



quercitrina (1)



afzelina (2)

I.1.3 Inflamação e cancro

O cancro é uma doença heterogénea multifactorial que se caracteriza por ser uma patogénese com uma natureza multifásica. O desenvolvimento do cancro, referido muitas vezes como carcinogénese, pode ser caracterizado de várias formas. Pode ilustrar-se pelas características essenciais das células e dos tumores, *ie* a proliferação autossuficiente, a insensibilidade a sinais anti-proliferativos, a evasão da apoptose, o potencial replicativo ilimitado, a manutenção da vascularização e invasão dos tecidos e metástase.^{16,17}

Outra forma consiste em considerar o desenvolvimento do cancro como um processo de três fases: a iniciação, a promoção e a progressão.¹⁸ A iniciação caracteriza-se por alterações do genoma da célula tais como mutações pontuais, a deleção de um gene e amplificação e rearranjos cromossomais que conduzem a alterações celulares irreversíveis. O desenvolvimento do tumor é promovido pela sobrevivência e expansão clonal destas células “iniciadas” e a progressão envolve o aumento substancial de tamanho do tumor e das metástases relacionadas com o crescimento do tumor.¹⁹

A acumulação de lesões genéticas, que é uma condição necessária ao desenvolvimento do cancro na fase da iniciação e está também envolvida na promoção e progressão do tumor, envolve a activação de proto-oncogenes ou a inactivação dos genes supressores dos tumores.

Nos últimos anos tem vindo a ser desenvolvido e reforçado o conceito de que existe uma associação entre a inflamação e o cancro.²⁰ Esta associação foi estabelecida pela primeira vez por Rudolf Virchow ao identificar, em 1863, a presença de células inflamatórias (leucócitos) em

amostras biopsadas de tumores os quais surgiam, por sua vez, em zonas de inflamação crónica.²¹ Desde então, dados epidemiológicos permitiram concluir que a infecção ou inflamação crónica predispõe o ser humano a vários tipos de cancro^{21,22}. Por exemplo, o desenvolvimento de carcinomas de estômago, do fígado, da vesícula biliar, da próstata e do pâncreas tem sido atribuído à inflamação gástrica induzida por *Helicobacter pylori*, à hepatite crónica, colecistite, atrofia inflamatória da próstata e pancreatite crónica, respectivamente.^{23,24,25} Por outro lado, os pacientes que possuem o síndrome do cólon irritável devido a colite ulcerativa ou a doença de Crohn possuem um risco acrescido de desenvolver cancro colorrectal²⁶ e o tratamento da colite com fármacos anti-inflamatórios vem reduzir esse risco.²⁷

No caso de algumas infecções virais, essa relação é compreensível uma vez que os genes, já modificados pelo vírus, podem contribuir para a formação das células iniciadas, como é o caso do vírus do papiloma humano (HPV).²⁸ Porém, a maior parte dos microorganismos associados ao cancro não têm a capacidade de transformar as células. No caso de certas estirpes da *Helicobacter pylori* sabe-se que possuem factores que afectam a sinalização da célula hospedeira mas não constituem oncogenes.¹⁹

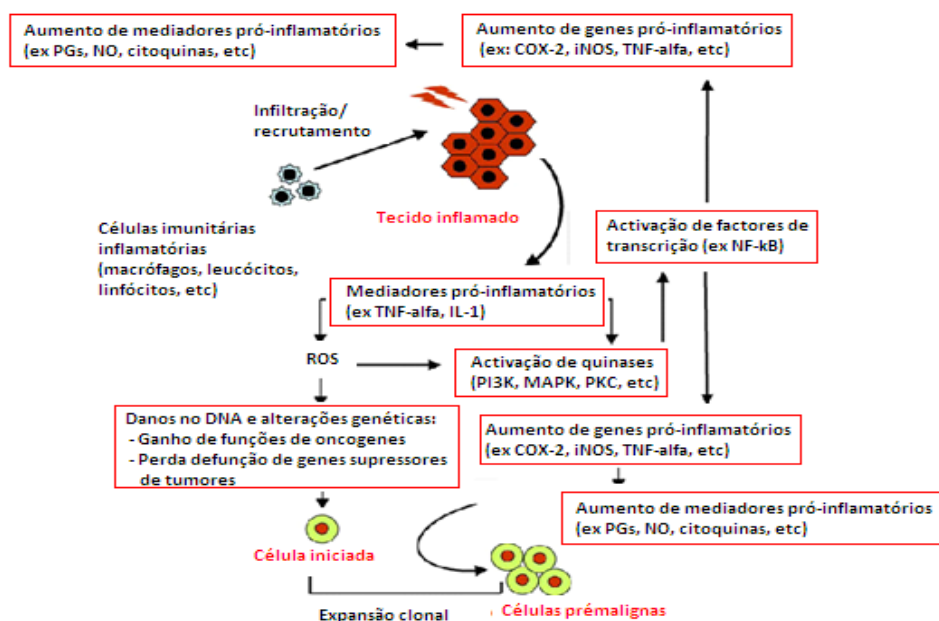


Figura I.1.2 Função da inflamação na promoção do tumor²⁹

A inflamação constitui um mecanismo de defesa imediato do hospedeiro contra a infecção de um microorganismo, danos dos tecidos ou estímulos nocivos. Qualquer perturbação na homeostasia do tecido activa as células do sistema imunitário que constituem um sistema de defesa de primeira linha. Essas células podem iniciar a resposta inflamatória através da libertação de mediadores como sejam as citocinas, as quimiocinas, as proteases remodeladoras da matriz e as espécies reactivas de oxigénio e de azoto que conduzem à eliminação dos agentes patogénicos e à reparação dos tecidos.²⁰ No entanto, qualquer falha no controle dos componentes do sistema imunitário pode conduzir à inflamação crónica, o que resulta em danos nos tecidos extensos devido à produção contínua de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) criando um microambiente propício ao desenvolvimento de patologias e favorecendo a iniciação e progressão do cancro.^{20,30}

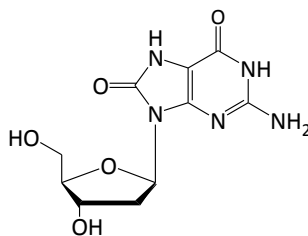
I.1.3.1 Função das espécies reactivas de oxigénio e de azoto

Nas fases de inflamação crónica, as células do sistema imunitário e inflamatório (os mastócitos, os neutrófilos, os leucócitos, os macrófagos, os monócitos, os eosinófilos, os fagócitos, células dendríticas e as células exterminadoras naturais) são normalmente recrutadas para o local da infecção ou inflamação.³¹ Aí, como resposta à inflamação, ocorre uma captação de oxigénio acrescida e as células produzem radicais livres: espécies reactivas de oxigénio tais como o radical hidroxilo (HO^\bullet), o anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio e espécies reactivas de azoto como o óxido nítrico (NO^\bullet) e o peroxinitrito (ONOO^\bullet).¹⁹ Estas moléculas são geradas por enzimas do hospedeiro tais como a mieloperoxidase produzida pelos neutrófilos e a eosinófilo peroxidase existente nos eosinófilos. Observou-se também por outro lado que as NADPH oxidases que são reguladas pelas vias de sinalização da inflamação, provocam danos no DNA conduzindo à activação de oncogenes e/ou inactivação de genes supressores de tumores.³⁰

A sobreprodução e acumulação destas espécies reactivas perturba o normal funcionamento da célula uma vez que provocam modificações químicas por reacções de oxidação, formação de NO_2^- e formação de ligações covalentes com os lípidos, proteínas e DNA das células.

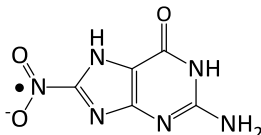
Os danos no DNA induzidos por espécies reactivas de oxigénio incluem quebras na cadeia, modificações das bases do DNA e ligações cruzadas o que resulta em erros de replicação e instabilidade genómica, contribuindo para a iniciação do tumor. Observou-se que o composto 8-oxo-7,8-di-hidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) (**3**), um dos principais marcos de danos

mutagénicos e oxidativos do DNA era produzido em células gástricas, num processo induzido por *Helicobacter pylori*.³²



8-Oxo-dG (3)

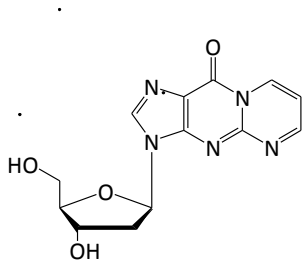
O óxido nítrico (NO^\bullet) é outra espécie reactiva, gerada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) durante a infecção e inflamação, que desempenha uma função na carcinogénese associada à inflamação por modificação do DNA e inactivação das enzimas que procedem à reparação do DNA.³³ Também o peroxinitrito, um produto que resulta da reacção entre o radical NO^\bullet e o anião superóxido, provoca danos no DNA ao dar origem à 8-nitroguanina (2), que é outro possível biomarcador de cancros associados a inflamação.



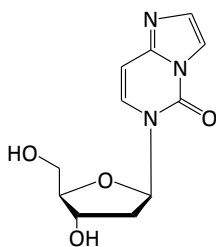
8-Nitroguanina (4)

Observou-se que os produtos de oxidação e nitrosação tais como o 8-oxo-dG (3) e 8-NG (4), se formavam em maior quantidade em células inflamatórias e em células tumorais do que em células saudáveis e participavam nas múltiplas fases de alterações genéticas que conduzem à progressão do tumor mediadas pela inflamação.^{22,34}

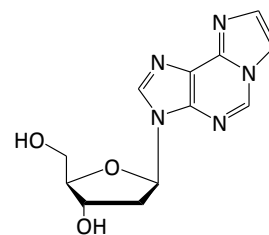
As modificações das proteínas como a carbonilação, a modificação do grupo tiol da cisteína e a formação de adutos proteicos estão associados a um risco acrescido de inflamação e transformação neoplásica das células.³¹ As espécies reactivas de oxigénio e de azoto podem ainda induzir a peroxidação dos lípidos e gerar outras espécies reactivas tais como o malondialdeído e 4-hidroxinonenal que são capazes de formar os adutos do DNA malondialdeído-desoxiguanosina (5), 1, N^6 -etenodesoxiadenosina (6) e 1, N^6 -etenodesoxicitidina (7).³⁵



Malondialdeído-desoxiguanosina (5)



3,N⁴-Etenodesoxicitidina (6)



3,N⁶-Etenodesoxiadenosina (7)

Existem algumas enzimas cuja função é defender de danos induzidos pelas espécies reactivas de oxigénio. A superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD) desempenha uma função determinante na protecção dos danos oxidativos provocados pelos radicais superóxido e de outras espécies de oxigénio reactivas. Um polimorfismo desta enzima que se encontra associada a uma menor actividade da Mn-SOD e por isso menor capacidade de defesa contra as espécies ROS, tem sido associada a riscos acrescidos de cancro.³⁶ A glutathionperoxidase humana é uma enzima dependente de selénio que participa na desintoxicação do peróxido de hidrogénio e de uma gama de peróxidos orgânicos por parte do glutathiono reduzido. Observou-se que um polimorfismo no codão 198 desta enzima provocava uma menor sensibilidade ao estímulo pelo selénio resultando num risco acrescido de cancro.³⁶

I.1.3.2 Função dos mediadores pro-inflamatórios

Durante a promoção do tumor ocorre a proliferação de uma célula iniciada originando um clone de células com mutação formando uma massa premaligna. Caso ocorram mutações adicionais, as células pré-neoplásicas tornam-se malignas. A este processo denomina-se progressão do tumor.

As células que proliferam, as células do estroma do hospedeiro que as rodeiam e as células do sistema imunitário e inflamatório infiltradas criam um microambiente que rodeia o tumor o qual reflecte um estado inflamatório persistente. No interior desse microambiente, vários mediadores pró-inflamatórios participam numa rede de sinalização complexa. De entre essas moléculas que medeiam a inflamação e o cancro destacam-se os factores de transcrição NF- κ B, as citocinas, as quimiocinas, a enzima COX-2, as prostaglandinas.

I.1.3.3 NF-kB

A família dos factores de transcrição NF-kB desempenha uma função muito importante na regulação das respostas do sistema imunitário e inflamatório e na carcinogénese.³⁷ Em células não estimuladas, o factor NF-kB encontra-se sequestrado e inactivo no citoplasma através de uma associação com o factor IκBs inibidor. A activação por uma série de estímulos como as citocinas inflamatórias como o factor de necrose do tumor TNF-α, as espécies reactivas de oxigénio (ROS), as infecções por microorganismos ou agentes carcinogénicos entre outros desencadeia a fosforilação que conduz à libertação de NF-kB. Nessa altura, o factor NF-kB entra no núcleo e activa os genes importantes para desencadear respostas imunitária e inflamatória, para a sobrevivência da célula e a proliferação celular.³⁸ De facto, observou-se que o factor de transcrição NF-kB se encontrava activado em amostras de tumores de células humanas, o que vem confirmar uma função importante no desenvolvimento de tumores associados a inflamação. Por esta razão, pode ser um alvo na quimioprevenção.³⁶

I.1.3.4 Citoquinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular que regulam diversos processos fisiológicos, tais como o crescimento, o desenvolvimento, a diferenciação, a cicatrização e a resposta imunitária. Em resposta à inflamação, as citocinas são segregadas pelas células do sistema imunitário. Algumas citocinas estimulam ou agravam a inflamação enquanto outras atenuam as respostas inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (ILs) e o factor de necrose tumoral (TNF-α) têm sido relacionadas com a carcinogénese associada à inflamação.³¹ Pensa-se que as citocinas activam as enzimas quinases a montante e os seus factores de transcrição a jusante que compreendem os circuitos de sinalização para levar a cabo as respostas celulares.³¹

Por outro lado o factor TNF-α, ao interagir com o seu receptor TNF-R activa o factor de transcrição NF-kB o qual conduz a uma indução aberrante de um conjunto de genes pró-inflamatórios implicados na carcinogénese do colorrectal associada à colite. Observou-se que o tratamento com anticorpos monoclonais suprimiam a actividade do factor NF-kB e reduziam o tamanho dos tumores.³⁹

I.1.3.5 Sirtuína 1

As sirtuínas (enzimas relacionadas com o *Silent Information Regulator 2*) constituem uma família de enzimas dependentes do NAD^+ que catalizam a desacetilação dos resíduos de lisina em diversas proteínas. Algumas possuem também a actividade de catalizar a transferência de um resíduo de ribose da molécula de ADP. As sirtuínas dos mamíferos SIRT1-7 estão envolvidas numa grande variedade de funções celulares tais como o silenciamento dos genes, o controle do ciclo celular e da apoptose e homeostasia energética.⁴⁰ De entre elas, a sirtuína 1 (SIRT1) é a melhor conhecida em termos de actividade celular. Estudos recentes mostraram que estava relacionada com as respostas inflamatórias e inibia o factor de transcrição NF- κ B, conduzindo à morte celular em resposta à citocina inflamatória TNF- α , podendo ser uma estratégia útil para tratar o componente inflamatório.^{41,42}

I.1.3.6 Interleuquina-8

As quimioquinas são uma classe de citocinas que regulam o movimento de células do sistema imunitário para o local da inflamação. Num microambiente tumoral, as quimioquinas são produzidas pelas células do tumor ou pelas células do estroma que o rodeiam e, juntamente com os seus receptores, desempenham uma função na associação entre inflamação e cancro. A produção de quimiokinas é activada por oncogenes e inactivada por genes supressores de tumores. No caso da interleuquina IL-8 constitui um alvo da sinalização do oncogene Ras.³¹ Observou-se ainda que a sinalização da IL-8 induzida por stress ou fármacos conferia resistência à quimioterapia por parte das células tumorais. Por isso, a inibição dos efeitos da IL-8 pode constituir uma intervenção terapêutica significativa.⁴³

I.1.3.7 Moléculas da via das prostaglandinas

As ciclo-oxigenases (COX) são as enzimas requeridas para a produção das prostaglandinas (PGs) a partir dos ácidos gordos. As PGs (em especial a PGE2) são mediadores chave nos processos de inflamação e em cancros associados à inflamação. Existem duas isoformas de ciclo-oxigenase: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em níveis relativamente baixos. A COX-2 é a forma da enzima que é induzida e responsável pelo aumento da actividade da ciclo-oxigenase devida à inflamação crónica. Inicialmente observou-se uma enorme expressão da COX-2 no adenocarcinoma do cólon. No entanto, sabe-se hoje que ocorre uma elevada expressão da COX-2

em quase todos os tumores examinados. Em particular em lesões pré-malignas, nas primeiras fases e nas últimas fases de cancro ocorre uma expressão de COX-2 aumentada, o que sugere que a actividade de COX-2 é necessária e suficiente para que ocorra a transformação de malignidade tanto em modelos *in vitro* como em animais. A actividade COX-2 e o subsequente aumento da PGE2 pode afectar a proliferação celular, as velocidades de mutação do DNA, a angiogénese, a apoptose e a metástase.²²

O metabolismo e transporte da PGE2 pode também contribuir para a carcinogénese de cólon. Um dos dados mais convincentes que demonstram a relação entre inflamação e cancro reside na observação de que certos fármacos anti-inflamatórios reduzem o risco de vários cancros. Os inibidores da ciclo-oxigenase são fármacos anti-inflamatórios não esteroidais.⁴⁴ Eles podem ser inibidores não específicos (ácido acetilsalicílico) ou inibidores selectivos (inibidores da COX-2). O uso a longo-termo tem sido associado a um risco reduzido de alguns tipos de cancro. Ensaio clínicos variados mostraram que fármacos anti-inflamatórios não esteroidais exercem uma função protectora contra adenomas do cólon, os quais são precursores do cancro de cólon. Isto indica que a inflamação activa pode contribuir para a carcinogénese e que a carcinogénese inflamatória pode ser evitável.²²

Como conclusão, podemos dizer que o cancro surge como um processo heterogéneo que tem subjacente uma grande variedade de factores etiológicos (biológicos, psicológicos, sociais, entre outros), os quais contribuem para alterações genéticas e uma transdução do sinal anormal. Embora esses factores etiológicos individuais sigam mecanismos distintos para o desenvolvimento dos tumores, a inflamação local e persistente do tecido é um factor comum no processo da carcinogénese. Nas últimas duas décadas tem sido feito um enorme esforço para compreender e revelar as ligações mecanísticas entre a inflamação crónica e o cancro.³¹

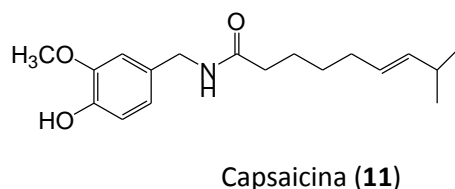
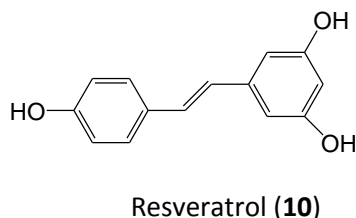
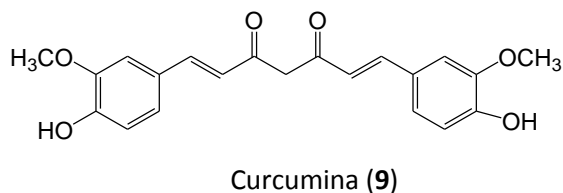
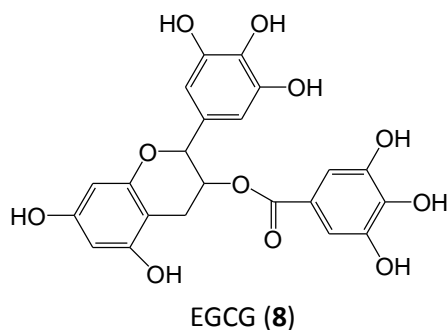
Sabe-se que, ao mesmo tempo que as doenças inflamatórias crónicas se vão transformando em tumores malignos específicos de cada órgão, o ambiente inflamatório local nos tumores benignos também contribui para um crescimento do tumor, para a invasão e metástase. Inúmeras redes de sinalização que compreendem os receptores de superfície da célula, as quinases intracelulares, as proteínas de ancoragem, os factores de transcrição, as proteínas ligadas à cromatina bem como uma gama ampla de mediadores lipídicos da inflamação foram identificados para explicar a base molecular da carcinogénese associada à inflamação. Apesar deste avanço

significativo na compreensão do fenómeno, ainda se está longe do objectivo de erradicar o cancro. Uma das razões que contribuem para este sucesso limitado está na dificuldade em traduzir para a prática clínica uma abordagem integrativa com base no mecanismo molecular que interliga a inflamação e o cancro. De qualquer forma é dada uma atenção redobrada na resolução das primeiras fases da inflamação de modo a evitar a sua influência na progressão do cancro.

Neste contexto, a prática de prevenção da carcinogénese associada à inflamação pode ser realizada de várias formas. Uma delas consiste em evitar as causas de danos dos tecidos tais como a exposição a agentes infecciosos, a agentes químicos e físicos, o controle da infecção por melhoria das condições sanitárias gerais.³⁶ Uma outra abordagem consiste em usar compostos químicos naturais ou sintéticos, não tóxicos como factores de protecção, para prevenir a carcinogénese quer para estimular a desintoxicação dos agentes carcinogénicos e dos seus potenciais metabolitos quer para parar, atrasar ou mesmo reverter a proliferação e subsequente malignização das células danificadas.⁴⁵

Uma vez que a rede de sinalização celular não funciona bem em muitos processos de doença (ex. o cancro) é razoável que a quimioprevenção pretenda actuar nas cascatas de sinalização de modo a conseguir evitar a carcinogénese.²⁹

Existe um grande conjunto de dados convincentes que advêm de estudos experimentais e clínicos que sugere que os constituintes da dieta alimentar podem prevenir múltiplas formas de cancro.²⁹ Muitos metabolitos produzidos por plantas da dieta alimentar possuem actividade quimiopreventiva. Exemplos são o éter da epigallocatequina presente no chá verde EGCG (**8**), a curcumina (**9**) de açafrão, o reverastrol (**10**) da uva, a capsaicina (**11**) da malagueta.²⁹



De entre estes metabolitos é de salientar estudos realizados sobre os mecanismos de acção do resveratrol (10) e da capsaicina (11). Do estudo sobre o mecanismo de acção do reverastrol como agente quimiopreventivo concluiu-se que tinha como alvos muitos componentes das vias de sinalização interna tais como o mediadores pró-inflamatórios, factores de transcrição e os seus reguladores, reguladores da sobrevivência da célula e da sua apoptose entre outros.⁴⁶ A capsaicina (11), presente na espécie *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) inibe a activação do factor de transcrição NF-kB em células de melanoma, conduzindo à indução da apoptose.²⁹ Para além disso, observou-se que a capsaicina inibe tanto a produção de radicais NO* como transcricionalmente a expressão da ciclo-oxigenase 2 e de NF-kB, entre muitas outras.²⁹

I.1.4 Doenças bacterianas

Na farmacoterapia das doenças bacterianas, o uso dos antibióticos tem reduzido significativamente a incidência das doenças infecciosas. No entanto, os efeitos secundários severos e a emergência de estirpes multirresistentes a fármacos tem constituído um problema crescente e preocupante à escala global e levou à procura de novos agentes antibacterianos mais específicos, mais eficientes e com menor toxicidade.⁴⁷

Na última década, as bactérias Gram positivas reemergiram como os agentes patogénicos predominantes do Homem, constituindo a principal causa de infecções adquiridas em hospitais. A bactéria *Staphylococcus aureus* é um agente patogénico virulento e invasivo que sintetiza um conjunto de toxinas pirogénicas e superantígenes os quais contribuem para a sua virulência. O aparecimento de um número crescente de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que se multiplicam rapidamente, constitui um dos problemas sérios de saúde pública nos países desenvolvidos.⁴⁸ A elevada incidência das infecções provocadas por MRSA conduziu ao uso de vancomicina como terapia. Ocorreu então o desenvolvimento rápido de agentes patogénicos resistentes à vancomicina tornando-se a principal causa de doença adquirida em hospital.⁴⁹

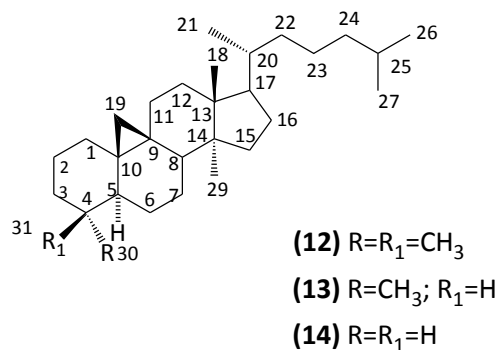
A modificação estrutural de fármacos antibacterianos para os quais tenha sido desenvolvida resistência mostrou ser um instrumento eficiente para aumentar o tempo de vida desses fármacos, incluindo as β -lactamas e as quinolonas. No entanto, é urgente o desenvolvimento de novas classes de compostos cuja estrutura difira da dos antibióticos convencionais e que actuem nas estirpes que apresentem multirresistência.⁵⁰

I.1.5 Terpenóides da série cicloartano

I.1.5.1 Estrutura

Os triterpenos da série cicloartano da série cicloartano constituem uma família de compostos com uma ampla diversidade estrutural e cuja biossíntese ocorre unicamente em organismos eucariotas fotossintéticos.

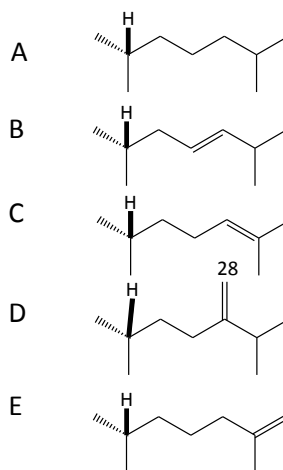
A estrutura química dos cicloartanos tem como base o esqueleto 9 β ,19-ciclo-5 α -lanostano (12).



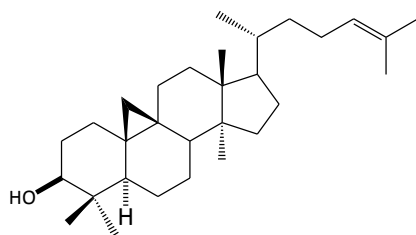
9 β ,19-ciclo-5 α -lanostano (cicloartano) **(12)**

Os derivados 4 α -monometilcicloartano **(13)** e o 4,4-demetilcicloartano ou 4,4-dihidrocicloartano **(14)** os quais são produto da reacção de desmetilação encontram-se relacionados biogeneticamente com os cicloartanos.

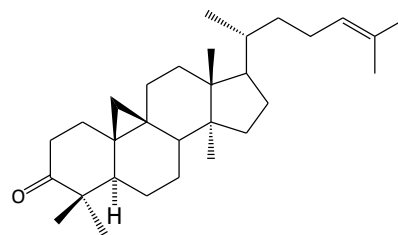
Para além do núcleo, os compostos são classificados de acordo com a cadeia lateral [A-E: saturada, 23(24)-eno, 24(25)-eno, 24(28)-eno e 25(26)-eno].



A designação de cicloartano foi atribuída ao primeiro composto a ser estruturalmente caracterizado, o cicloartenol **(15)**, obtido a partir da cetona correspondente, a cicloartenona **(16)**, que foi isolada dos frutos de *Artocarpus integrofolia* L. por Barton em 1951.⁵¹ Mais tarde, Spring e colaboradores extraíram o cicloartenol de *Strychnos nux-vomica* L. (Longaniaceae)⁵² mas cedo se tornou claro que o cicloartenol e os seus análogos pouco polares se encontravam distribuídos pelo reino vegetal e eram precursores ou intermediários da biogénese de fitosteróis.



Cicloartenol (**15**)

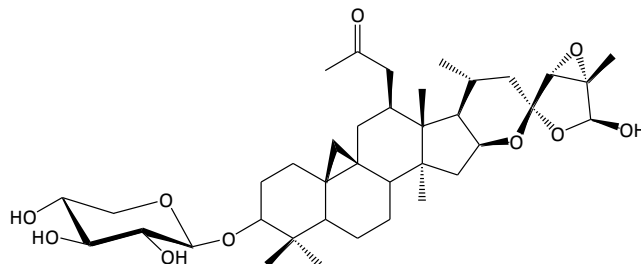


Cicloartenona (**16**)

As plantas que se verificaram serem fonte desta família de cerca de 900 compostos pertencem a 50 famílias, 90 géneros e 200 espécies. As plantas dos géneros *Astragalus*, *Thalictrum* e *Cimicifuga* constituem fontes particularmente ricas.

Estes compostos ocorrem na livres na Natureza, como ésteres de vários ácidos orgânicos e como glicosídeos. Foram também descritos compostos contendo grupos amida.

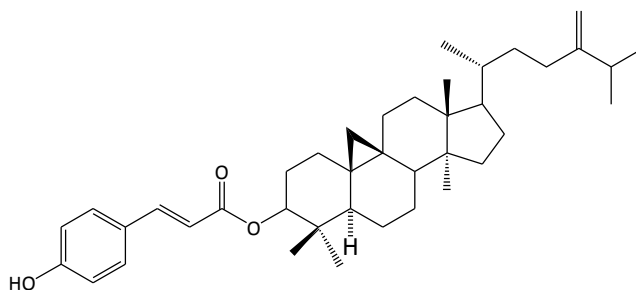
A acteína (**17**) foi o primeiro glicosídeo de cicloartano a ser isolado de *Actaea racemosa* [*Cimicifuga racemosa* (L.), Ranunculaceae]. No entanto, a sua estrutura só foi elucidada em definitivo recentemente.⁵¹



Acteína (**17**)

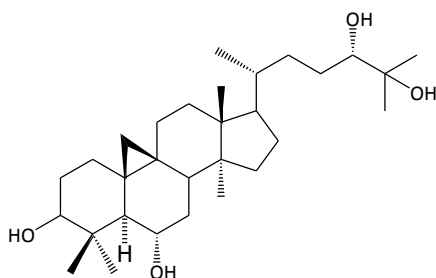
De entre as unidades de carbo-hidrato presentes nos derivados glicosídicos encontram-se a D-xilose, a D-glucose, a D-galactose, a D-alose, D-apiose, a D-fucose, o ácido D-glucurónico, a L-arabinose e a L-ramnose.

Os cicloartanos e seus glicósidos têm sido isolados sob a forma de ésteres do ácido acético, tíglico, 2-metilbutanóico, crotónico, malónico, palmítico, benzoico, *p*-hidroxicinâmico (isómeros *E*- e *Z*), ácido ferúlico e isoferúlico. O 24-metilenocicloartenil-*p*-hidroxicinamato (**18**) é um exemplo, derivado do ácido cinâmico isolado de *Cirrhopetalum elatum* (Orchidaceae).⁵³



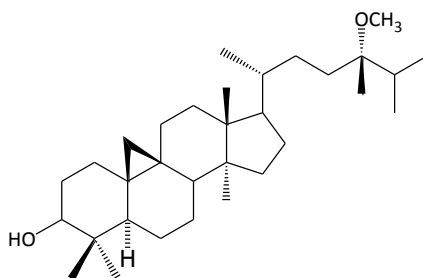
24-metilenocicloartenil-*p*-hidroxicinamato (**18**)

Apesar do cicloartenol e dos seus análogos pouco polares serem considerados precursores dos fitoesteróides e elementos estruturais das membranas celulares, os compostos polihidroxilados e os derivados glicosilados como a ciclo-asgenina C (**19**), isolada de *Astragalus taschkenticus* Bunge⁵³ encontram-se menos distribuídos pelo reino vegetal.



Cicloasgenina C (**19**)

Os éteres também ocorrem com frequência, sendo os mais comuns os éteres *O*-metílicos, dos quais é exemplo o 24-metoxi-24-metilcicloartanol (**20**) extraído de óleo de farelo de arroz.⁵¹

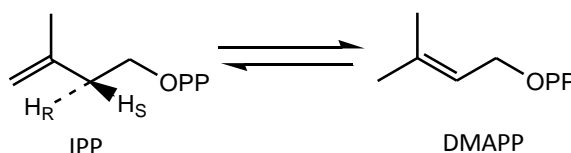


24-metoxi-24-metilcicloartanol (**20**)

A presença de um triterpeno com um anel de três membros 1,1,2,2-tetrassubstituído (anel 9 β ,19) constitui uma característica estrutural importante para classificar um composto como pertencendo à série de cicloartano. Esta característica pode ser facilmente identificada pela presença dos sinais dos prótons não equivalentes do metileno do cicloartano que surgem no espectro de ^1H RMN na gama de δ -0,15 a 1,90 ppm como dupletos de um sistema AX com uma constante de acoplamento a duas ligações $^2J=4$ Hz. Os valores do desvio químico destes prótons em C-19 dependem da presença de substituintes nos anéis A e C. A presença de uma banda a 3040 cm^{-1} , no espectro no infravermelho, atribuída às vibrações de alongamento das ligações C-H do metileno do ciclopropano confirma também a presença do cicloartano.⁵²

I.1.5.2 Biossíntese dos triterpenos

Os terpenóides constituem uma família vasta de compostos, presentes em todos os organismos vivos, com uma grande diversidade estrutural e funcional, possuindo entre si uma relação biogenética com base em dois metabolitos chave: o difosfato de isopentenilo (IPP) e o seu isômero alílico, o difosfato de dimetilalilo (DMAPP).



Estruturalmente, os terpenos podem ser considerados como produtos da reacção de condensação cabeça-cauda destas duas unidades isoprénicas e as unidades de isopreno adicionais vão sendo inseridas por reacções de condensação sucessivas com difosfato de isopentenilo catalisadas por preniltransferases. Por esta razão as estruturas típicas possuem esqueletos carbonados representados por $(\text{C}_5)_n$ e classificam-se como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Para além da repetição de unidades de isopreno, ocorrem reacções de ciclização, rearranjos e reacções de oxidação do esqueleto carbonado, as quais são responsáveis pela enorme diversidade de estruturas encontradas na Natureza.⁵⁴

Estudos biossintéticos mostraram que, nas plantas superiores, os dois metabolitos chave difosfato de isopentenilo (IPP) e difosfato de dimetilalilo (DMAPP) podem ser sintetizados por duas vias: a via do ácido mevalónico (MVA) e pela via do fosfato de metileritritol (MEP).⁵⁴

A conversão de difosfato de isopentenilo em difosfato de dimetilalilo, catalisada por uma isomerase, origina um electrófilo reactivo e, desta forma um bom agente alquilante. Por outro lado, o DMAPP possui um bom grupo de saída - o difosfato - pelo que pode ionizar-se facilmente, formando um carbocátion alílico estabilizado por ressonância. A dupla terminal do IPP actua como nucleófilo.

A biossíntese de pirofosfato de farnesilo (FPP) envolve a ionização de DMAPP, originando o catião alílico, seguido da adição da ligação dupla de difosfato de isopentenilo e da perda estereoespecífica de um protão dando o pirofosfato de geranilo (GPP). De seguida, ocorre de novo a saída do grupo difosfato, a formação do catião alílico, a adição da ligação dupla de uma nova molécula de difosfato de isopentenilo e a perda estereoespecífica de um protão.

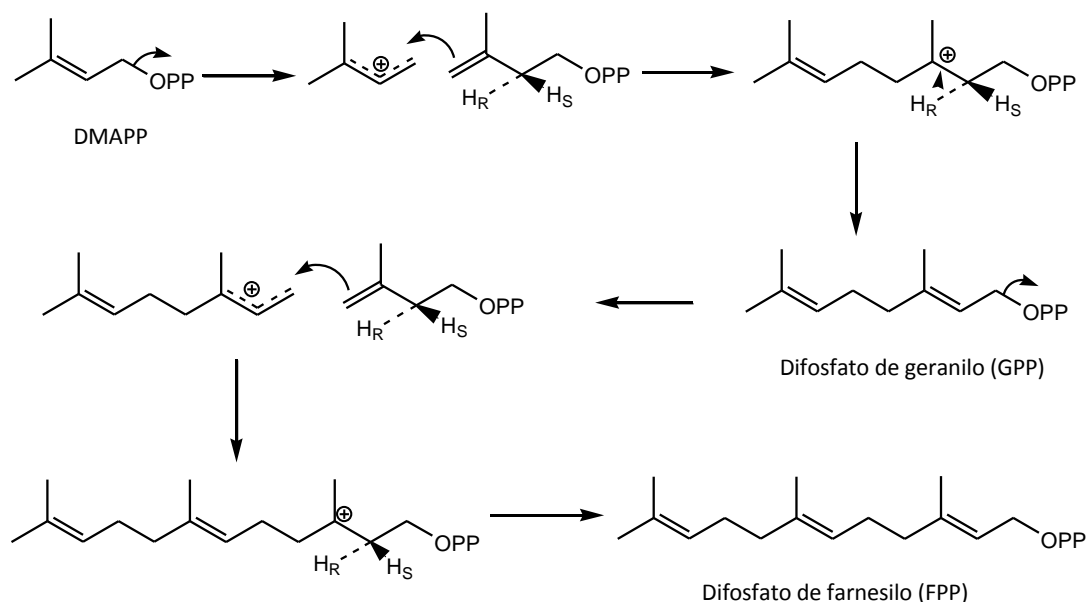


Figura I.1.3 Biossíntese de difosfato de farnesilo (FPP).

Foi evidenciado que os triterpenos não são formados pela extensão da cadeia dos sesterterpenos por reacções de condensação sucessivas com o difosfato de isopentenilo. Em vez disso, ocorre uma reacção de condensação de duas moléculas de difosfato de farnesilo (C₁₅) cauda a cauda formando o esqualeno.

Na formação do esqualeno, ocorre a perda de um grupo difosfato de uma das moléculas do difosfato de farnesilo (FPP) originando o catião farnesilo seguido pelo ataque, mecanisticamente equivalente à extensão da cadeia usando IPP, da ligação dupla 2,3 da outra molécula de FPP. Ocorre então a perda de um próton e a formação de um anel de ciclopropano dando o difosfato de pré-esqualeno. A saída do difosfato gera um catião primário desfavorável o qual, através de um rearranjo de Wagner-Meerwein, origina um carbocatião terciário e forma a ligação C-1 – C-1'. A quebra da ligação original C-1 – C-2' origina o catião alílico que é neutralizado pela transferência de hidreto pelo NADPH.⁵⁵

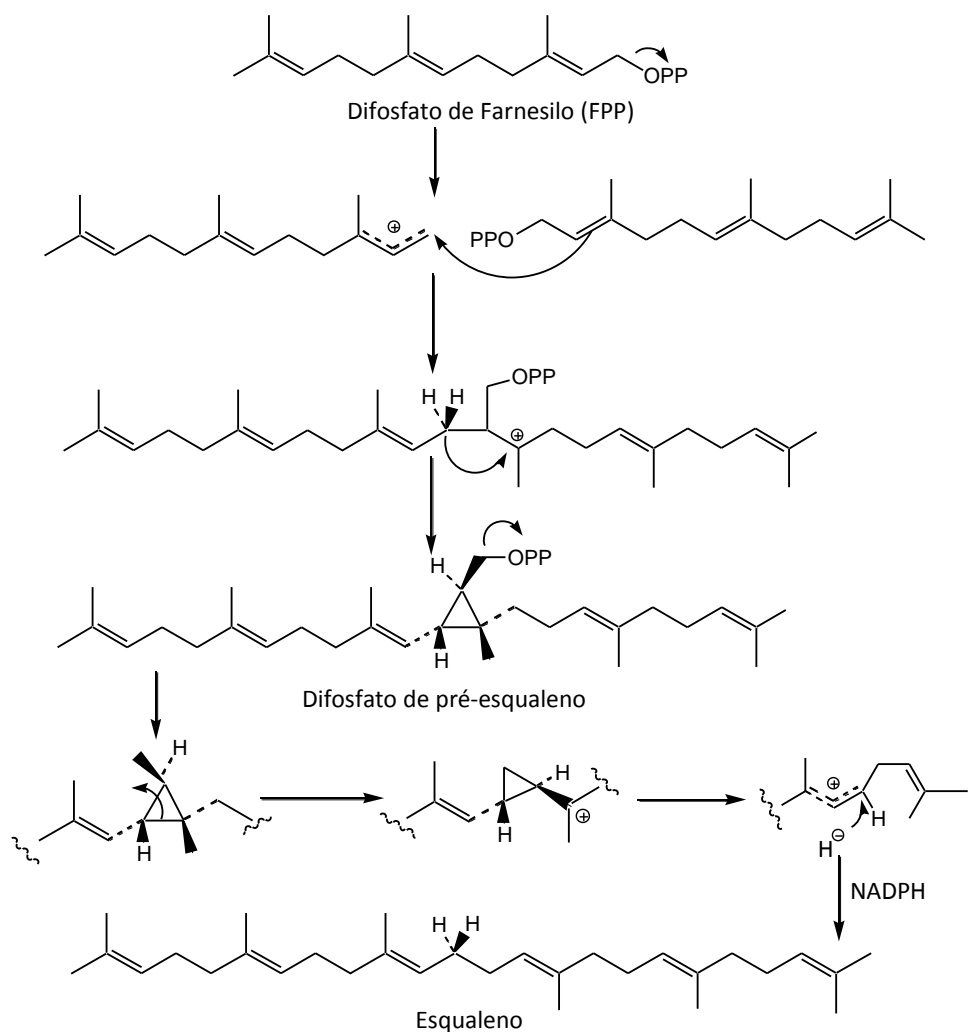


Figura I.1.4 Biossíntese de esqualeno.

A ciclização do esqualeno envolve a formação inicial do óxido de (3S)-2,3-esqualeno produzido numa reacção catalisada pela enzima esqualeno epoxidase, uma flavoproteína que

requer oxigénio e NADPH como cofactores. Se o óxido de esqualeno estiver na conformação adequada à superfície da enzima, ocorre a formação de estruturas triterpénicas policíclicas como resultado de uma série de ciclizações e de migrações concertadas de hidretos e de grupos metilo. O processo é iniciado pela protonação do óxido de esqualeno, provocando a abertura do epóxido, a formação de um carbocatião terciário, a adição electrofílica da ligação dupla e a formação de um novo catião terciário. As ciclizações são mediadas por carbocátions. O processo repete-se duas vezes gerando preferencialmente, de acordo com a regra de Markovnikov, um carbocatião terciário após cada fecho do anel. Como o terceiro anel tem apenas cinco membros, a expansão para um anel de 6 membros ocorre via um rearranjo de Wagner-Meerwein.

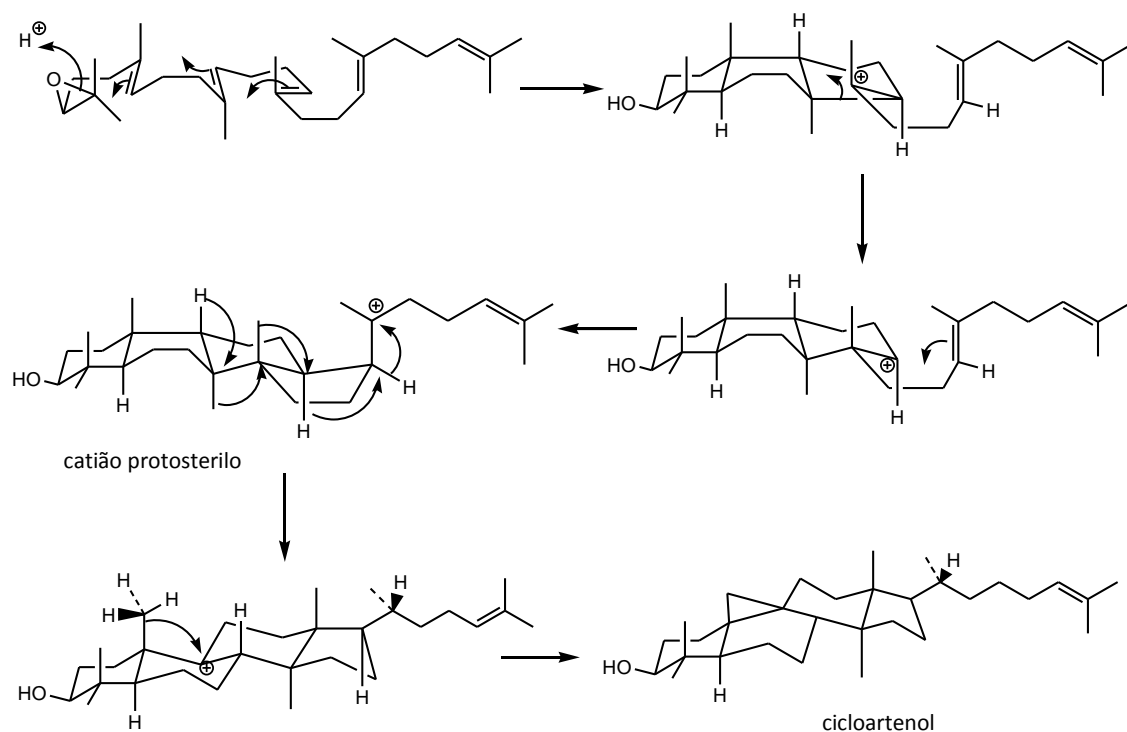


Figura I.1.5 Biossíntese de cicloartenol.

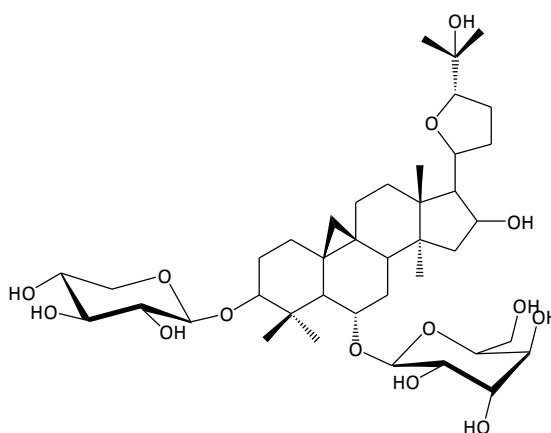
Uma adição electrofílica posterior gera o catião protosterilo, cuja estereoquímica depende do enrolamento que ocorreu à superfície da enzima. Se o óxido de esqualeno assumir uma conformação cadeira-barco-cadeira-barco, forma-se o catião protosterilo. Nas plantas este intermediário dá origem ao cicloartenol o qual possui um anel de ciclopropano gerado por inclusão do carbono do metilo em C-10. Ocorre a migração do hidreto H-9 para C-8, e o

carbocatião formado é extinto após a formação do ciclopropano e perda de um dos prótons do metilo em C-10.

I.1.5.3 Actividade Biológica

As plantas dos géneros *Cimicifuga* e *Astragalus*, ricas em cicloartanos, são geralmente utilizadas na medicina tradicional.⁵³ Observou-se que a actividade de um extracto não purificado de *Astragalus sieversianus* apresentava actividade diurética e hipotensora e prevenia o aparecimento de úlceras gástricas.

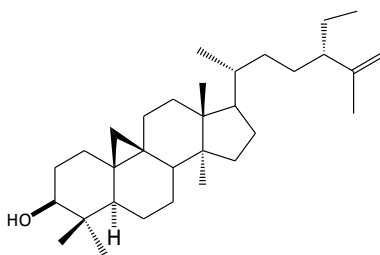
O ciclosieveriosido F (**21**) isolado a partir da planta apresentou actividade hipotensora, anti-inflamatória, analgésica e sedativa. Este derivado glicosídico acelera o metabolismo das proteínas no soro e no fígado, e exibe um efeito imunoestimulador e cardiotónico.⁵³



Ciclosieveriosido F (**21**)

A actividade quimiopreventiva de uma série de quarenta e oito cicloartanos, dos quais trinta de origem natural, foi demonstrada pelo trabalho de Kikuchi *et al.*⁵⁶ Estes compostos inibiram a indução do antígeno anterior do vírus Epstein-Barr (EBV EA) e a activação de um dador de óxido nítrico ((±)-(E)-metil-2-[(E)-hidroximino]-5-nitro-6-metoxi-3-hexemida (NOR 1)) provocados por um promotor de tumor (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)). Dois desses compostos, o (24ξ)-24-metilcicloartano-3β,24,24'-triol e o (24ξ)-24'-metoxi-24-metilcicloartano-3β,24-diol apresentaram efeitos inibidores, em ensaios realizados *in vivo*, na carcinogénese iniciada com 7,12-dimetilbenz-[a]antraceno (DMBA) e promovida com TPA.⁵⁶

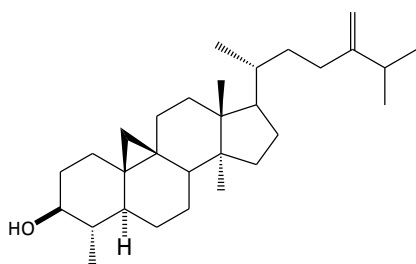
Por outro lado, Ramirez-Cisneros *et al.* vieram demonstrar a actividade anti-inflamatória do ciclomargenol (**22**).⁵⁷



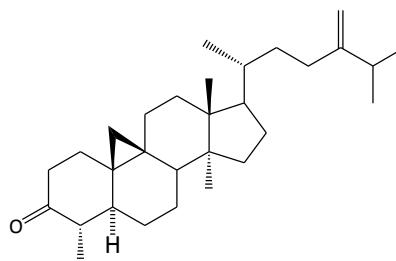
Ciclomargenol (**22**)

Foi também descrita a actividade de séries de cicloartanos, isolados das plantas *Vatica cinerea*⁵⁸ e de *Gardenia obtusifolia*,⁵⁹ como agentes anti-HIV de origem natural.

O cicloeucalenol (**23**) e a cicloeucalenona (**24**) isolados de *Tinospora crispa* produzem efeitos cardiotónicos⁶⁰



cicloeucalenol (**23**)



cicloeucalenona (**24**)

Como resumo podemos afirmar que os triterpenos da série de cicloartano apresentam actividade hipolipidémica, hipotensora, diurética, anti-inflamatória, sedativa, analgésica imunoestimulante e cardiotónica. Também foi descrita actividade antiviral, antitumoral. Alguns compostos mostraram ser indutores do interferão.⁵¹

I.1.6 Amidas dos ácidos hidroxicinâmicos

As amidas dos ácidos hidroxicinâmicos (Hydroxy Cinnamic Acid Amides-HCAAs) constituem um grupo de metabolitos secundários que possuem uma função determinante nos processos de

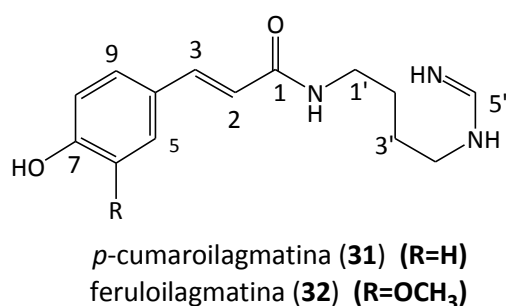
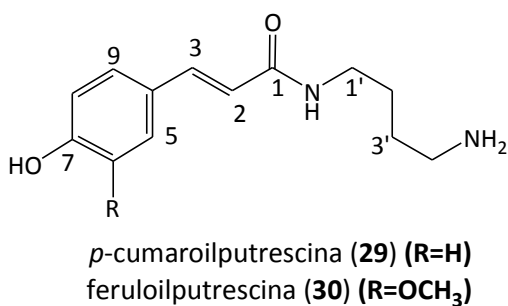
floração, de desenvolvimento das sementes e de defesa das plantas. Estes metabolitos encontram-se amplamente distribuídos nas famílias *Asteraceae*, *Liliaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae* ou *Fabaceae*.⁶¹

I.1.6.1 Estrutura

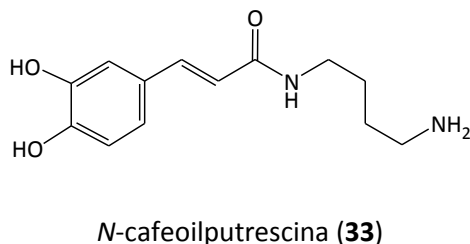
Do ponto de vista estrutural, as amidas dos ácidos hidroxicinâmicos caracterizam-se por possuir uma poliamina acilada com um ácido hidroxicinâmico mono-, di- ou trissubstituído (coumárico, ferúlico, cafeico e sinápico).

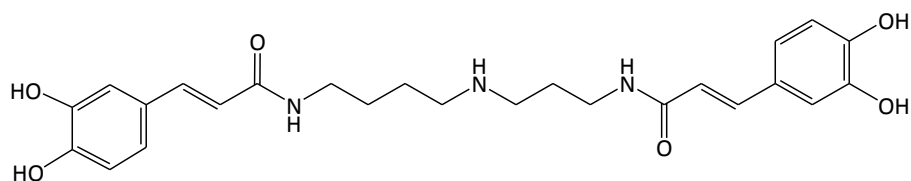
De acordo com a natureza da poliamina, podem ser distinguidos dois tipos de amidas dos ácidos hidroxicinâmicos com propriedades químicas e físicas características: as amidas básicas e as amidas neutras.

As amidas básicas possuem uma função de amina primária, são solúveis em água e resultam da acilação de poliaminas alifáticas como a putrescina (**25**), a espermidina (**26**), a espermina (**27**) e a agmatina (**28**) (Figura I.1.6). Neste grupo incluem-se a *p*-cumaroilputrescina (**29**),⁶² a feruloilputrescina (**30**),⁶² a *p*-cumaroilagmatina (**31**) e a feruloilagmatina (**32**).⁶³



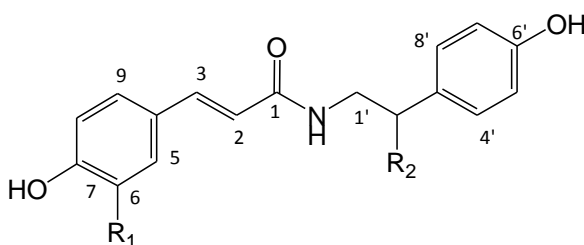
A *N*-cafeoilputrescina (**33**) e a *N,N'*-dicafeolespermidina (**34**) foram identificadas nos frutos de *Solanum melongena* L..⁶⁴





N,N'-dicafeolespermidina (**34**)

As amidas neutras não possuem funções fortemente ionizáveis, são insolúveis em água e contêm na sua maioria aminas aromáticas tais como a tiramina (**35**), a octopamina (**36**), a dopamina (**37**) e a triptamina (**38**).⁶² Neste grupo de metabolitos incluem-se a *N-trans-p*-cumaroiltiramina (**39**) e a *N-trans*-feruloiltiramina (**40**) isoladas de *Solanum melongena* L.⁶⁵, *S. khasianum*,⁶⁶ *S. lycopersicum* cv. Rutgers,⁶⁷ *S. tuberosum*^{68,69} e *Schizanthus litoralis*.⁷⁰ A *N-trans-p*-cumaroiloctopamina (**41**), a *N-trans*-feruloil-octopamina (**42**), a *N-cis-p*-cumaroiloctopamina (**43**), a *N-cis*-feruloil octopamina (**44**) isoladas de *S. melongena*⁶⁵ e de *S. tuberosum*^{68,69} pertencem também a este grupo.

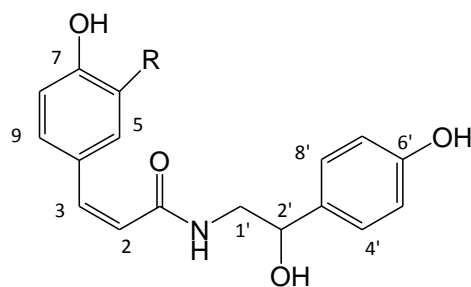


N-trans-p-cumaroiltiramina (**39**) ($R_1=H$, $R_2=H$)

N-trans-feruloiltiramina (**40**) ($R_1=OCH_3$, $R_2=H$)

N-trans-p-cumaroiloctopamina (**41**) ($R_1=H$, $R_2=OH$)

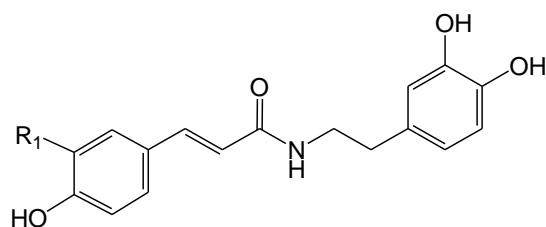
N-trans-feruloiloctopamina (**42**) ($R_1=OCH_3$, $R_2=OH$)



N-cis-p-cumaroiloctopamina (**43**) ($R=H$)

N-cis-feruloiloctopamina (**44**) ($R=OCH_3$)

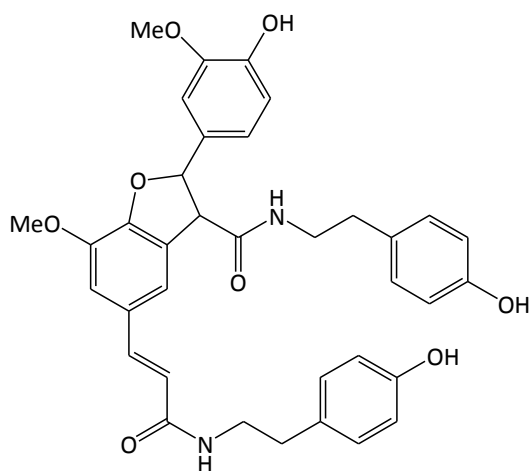
Foram igualmente isoladas de *Solanum lycopersum* cv. Rutgers as aminas aromáticas *N-trans-p*-cumaroil dopamina (**45**) e *N-trans*-feruloildopamina (**46**).⁶⁷



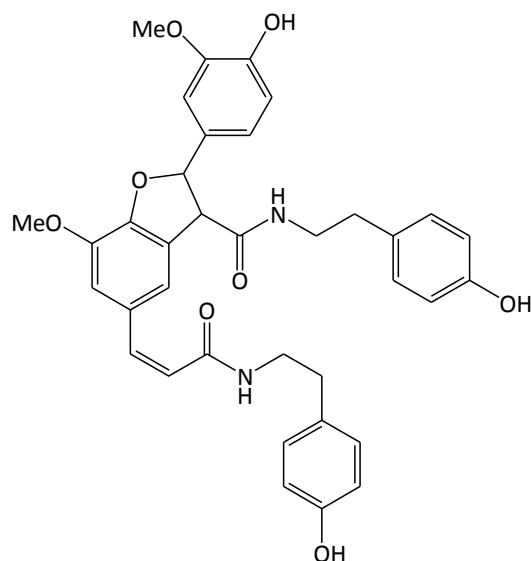
N-trans-p-cumaroildopamina (45) (R₁=H)

N-trans-feruloildopamina (46) (R₁=OCH₃)

Embora os conjugados de poliaminas que ocorrem na Natureza tenham geralmente estruturas lineares, foram extraídos de *Solanum tuberosum* os metabolitos resultantes da dimerização da *N-trans* e da *N-cis*-feruloiltiramina: a *N-trans*-grossamida (**47**) e a *N-cis* grossamida (**48**).⁶⁸



N-trans-grossamida (47)



N-cis-grossamida (48)

Para além de dímeros, foram também identificados derivados poliazamacrocíclicos em diferentes famílias de plantas, os quais apresentam grande complexidade estrutural.

De um modo geral, pode dizer-se que os alcalóides desta família podem diferir entre si na natureza (básica ou neutra), no estado de oxidação e no número de cadeias do fragmento de poliamina. Por outro lado, o fragmento carboxílico (em geral ácido cinâmico) pode apresentar diferentes graus de substituição (metilação e hidroxilação).

I.1.6.2 Biossíntese das HCAAs

As HCAAs são formadas através da condensação de uma forma activada dos ácidos cinâmicos (*i.e.* de ésteres de coenzima A) com aminas alifáticas e aromáticas, tal como se encontra ilustrado na Figura 3.

Estas reacções de condensação para formar as amidas dos ácidos hidroxicinâmicos requerem que os ácidos cinâmicos sejam previamente activados na forma de éster de coenzima A, catalisadas por ligases. Os tioésteres hidroxicinamoil-CoA (*p*-cumaroil-CoA (**49**), cafeoil-CoA (**50**) e feruloil-CoA (**51**)), que constituem as formas activadas dos ácidos cinâmicos, derivam do ácido *trans*-cinâmico (**52**). O ácido *trans*-cinâmico forma-se a partir da L-fenilalanina (**53**), após eliminação bimolecular de uma molécula de amónia da cadeia lateral, catalisada pela enzima fenilalanina amónia liase (PAL). A hidroxilação do ácido cinâmico, dependente do citocrómio P450, origina o ácido *p*-cumárico (**54**). Em certos membros das famílias *Graminae* e *Poaceae*, o ácido *p*-cumárico pode formar-se a partir da tirosina (**55**) após eliminação bimolecular de uma molécula de amónia, catalisada pela tirosina amónia liase (TAL).⁵⁵

Outros ácidos cinâmicos formam-se por reacções de hidroxilação e metilação do ácido *p*-cumárico, originando os modelos de substituição típicos dos metabolitos da via do ácido xiquímico *i.e.* um modelo de substituição *orto*. A hidroxilação do ácido *p*-cumárico origina o ácido cafeico (**56**) e a metilação de um dos grupos OH do ácido cafeico para formar o ácido ferúlico (**57**) ocorre de acordo com um mecanismo de substituição nucleofílica SN₂ catalisado por uma metiltransferase com participação de S-adenosilmetionina como grupo dador.

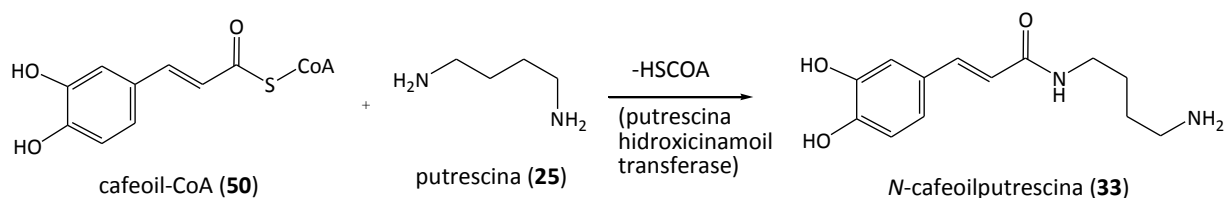
Na biossíntese das poliaminas, a putrescina (**25**) pode formar-se por descarboxilação da L-ornitina (**58**) catalisada pela ornitina descarboxilase e indirectamente a partir da L-arginina (**59**). A via da arginina envolve uma descarboxilação inicial catalisada pela arginina descarboxilase formando a agmatina (**28**), seguida da hidrólise da função imina no sistema guanidínico catalisada pela agmatina imino-hidrolase para dar a *N*-carbamoilputrescina (**60**) e da hidrólise da ureia catalisada pela enzima *N*-carbamoilputrescina hidrolase.

A espermidina (**26**) e a espermina (**27**) formam-se a partir da putrescina (**25**) por reacções de *N*-alquilação em que ocorre a transferência de um ou mais fragmentos aminopropilo de uma

molécula de *S*-adenosilmetionina descarboxilada para a putrescina e para a espermidina, respectivamente, catalisada pela enzima adenosilmetionina descarboxilase.⁵⁵

As aminas aromáticas formam-se a partir da tirosina (**55**) e do triptofano (**61**), por reacções de descarboxilação ou de hidroxilação que originam a tiramina (**35**), a dopamina (**37**) e a triptamina (**38**).⁵⁵

Finalmente, a biossíntese das HCAAs ocorre via formação de uma ligação amida entre um grupo amina das poliaminas e os ésteres de CoA. Como exemplo a enzima putrescinahidroxicinamoiltransferase catalisa a transferência do grupo ácido hidroxicinâmico do cafeoil-CoA (**50**) para a putrescina (**25**) originando a amida do ácido hidroxicinâmico *N*-cafeoilputrescina (**33**).



I.1.6.3 Actividade Biológica

As HCAAs encontram-se presentes num vasto conjunto de espécies vegetais. Desempenham funções importantes no desenvolvimento da planta,⁷¹ nas interacções planta-planta,⁷² planta-agente patogénico,⁶² planta-insecto⁷³ e planta-meio ambiente.⁷⁴

A possibilidade de as HCAAs terem uma função no desenvolvimento das espécies vegetais assenta na relação observada entre a acumulação destes metabolitos e o desenvolvimento de flores e outros órgãos. Assim, foram identificadas as amidas básicas *N*-cafeoilputrescina (**33**) e *N*-cafeoilespermidina em ápices dos rebentos, folhas novas e órgãos reprodutores femininos durante a indução floral na planta *Nicotiana tabacum* L.. Por outro lado verificou-se a acumulação de *p*-cumaroiltiramina (**39**) nos órgãos reprodutores masculinos.⁶² A acumulação de HCAAs específicas está também ligada ao processo de tuberização na espécie *Solanum tuberosum*. Foram observados níveis elevados de *p*-cumaroilputrescina (**29**), cafeoilputrescina (**33**), feruloilputrescina

(**30**) nos estolhos durante a formação dos tubérculos. Por outro lado a *N-trans*-feruloiltriptamina é inibidor da germinação de espécies vegetais (*Lactuca sativa* L., *Lycopersum esculentum* L., *Allium cepa*) o que abre caminho a estudos de aplicação como herbicida natural.⁷²

Pensa-se que as amidas dos ácidos hidroxicinâmicos são metabolitos biossintetizados pela planta como resposta à infecção por agentes patogénicos mediando desta forma a interacção entre as espécies. De acordo com Keller *et al.*⁷⁵ durante a expressão da resistência à infecção por fungos estes compostos ligam-se às paredes celulares das plantas das espécies *Graminea* e *Solanaceae* formando uma barreira fenólica que torna as paredes celulares mais resistentes à hidrólise enzimática. O trabalho de McLusky *et al.* veio mostrar que a exposição de *Allium cepa* a *Botrytis allii* resultava no aparecimento de depósitos granulares destes metabolitos na face interior da parede celular, fora da membrana celular.⁷⁶

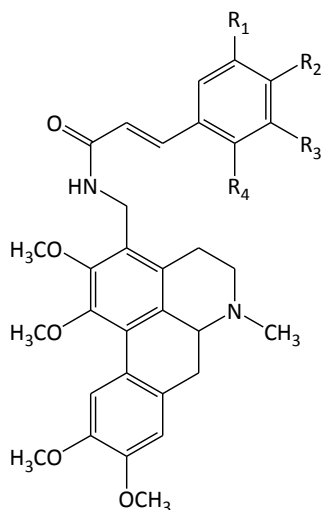
A função de defesa para fungos assenta num conjunto de observações como a acumulação de *p*-cumaroilagmatina (**30**) induzida nas folhas de cevada infectadas com o fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*⁷⁷ e a acumulação de *p*-cumaroiltiramina (**39**) e de feruloiltiramina (**40**) induzidas na folha da *Solanum tuberosum* pela infecção com *Phytophthora infestans*.⁷⁵ Observou-se igualmente que a feruloilputrescina (**50**) se acumulava em tubérculos de *S. tuberosum* infectados com *Phoma exigua*.⁷⁸

A actividade antibacteriana de um conjunto largo de HCAAs foi testada para as bactérias *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*) e *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*). Observou-se que, de entre os compostos testados, os derivados que possuíam um fragmento cafeóilo eram mais activos para a estirpe *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) do que os compostos de referência. Estes compostos apresentaram também actividade antibacteriana para a estirpe MRSA, sendo mais potentes do que a oxacilina.⁷⁹ Foi também relatada a actividade dos isómeros *cis* e *trans* da *p*-cumaroiloctopamina (**43**) e (**41**) e dos isómeros *cis* e *trans* (**44**) e (**42**) da feruloiloctopamina isolados de *Solanum lycopersicum* para a bactéria *Pseudomonas syringae*.⁸⁰

A actividade antitumoral da *N-trans-p*-cumaroiltiramina (**39**) para as linhas celulares U937 e Jurkat foi referida pelo trabalho de Park e Schoene.⁸¹

Introdução

Foi também descrita actividade oxidante e antiviral dos derivados cinamoil e hidroxicinamoil da glaucina (**62** a **66**) para os virus Polyovirus tio 1, coxsackievirus B1 e echovirus 13.⁸²



N-cinamoil-*trans*-3-aminometilglaucina (**62**) (R₁=H, R₂=H, R₃=H, R₄=H)

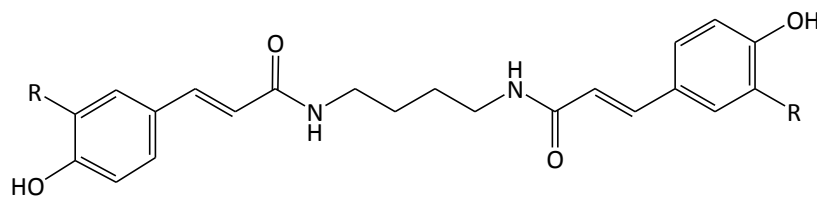
N-feruloil-*trans*-3-aminometilglaucina (**63**) (R₁=OCH₃, R₂=OH, R₃=H, R₄=H)

N-sinapoil-*trans*-3-aminometilglaucina (**64**) (R₁=OCH₃, R₂=OH, R₃=OCH₃, R₄=H)

N-*o*-cumaroil-*trans*-3-aminometilglaucina (**65**) (R₁=H, R₂=H, R₃=H, R₄=OH)

N-*p*-cumaroil-*trans*-3-aminometilglaucina (**66**) (R₁=H, R₂=OH, R₃=H, R₄=H)

A *p*-dicumaroilputrescina (**67**) e a diferuloilputrescina (**68**) isoladas do extracto etanólico de farelo de milho exibiram actividade anti-inflamatória ao inibir a produção de óxido nítrico, a expressão das isoformas induzidas da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e o factor de transcrição NF-kB. Estes resultados sugeriram que o farelo de milho pode constituir uma fonte de agentes anti-inflamatórios naturais.⁸³



dicumaroilputrescina (**67**) (R=H)

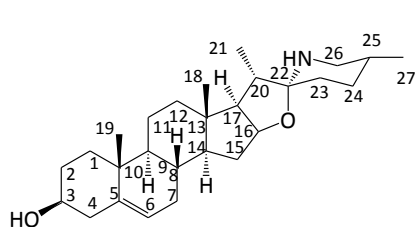
diferuloilputrescina (**68**) (R=OCH₃)

I.1.7 Glicoalcalóides esteroidais

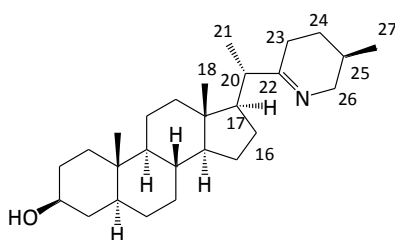
Os glicoalcalóides esteroidais constituem uma classe de metabolitos secundários activos isolados de espécies de *Solanaceae* e *Liliaceae*.

Os alcalóides esteroidais ocorrem na forma livre ou glicosilada. O fragmento glicosídico consiste de uma cadeia hidrofílica composta por uma ou mais unidades de açúcar a qual se encontra ligada à posição 3-OH de uma alcalmina (alcalóide) esteroideal.⁸⁴

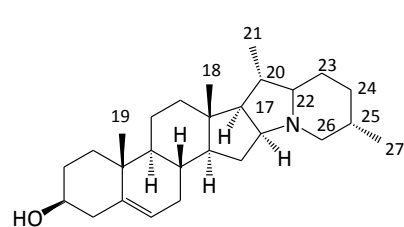
As alcalminas esteroidais, que possuem uma estrutura derivada do colestano em C-27, cuja cadeia lateral sofreu uma modificação para produzir um análogo azotado de um espirocetal, pertencem a um dos cinco grupos que representam os diferentes tipos de estrutura: i) os **espirosolanos** que incluem na sua estrutura um sistema de anel heterocíclico básico dos alcalóides espiro-aminocetal (tipo solasodina (**69**)), por analogia ao termo “espirostanos”, que designa a estrutura base das sapogeninas esteroidais, ii) os **22,26-epiminocolestanos** 16-insubstituídos (como exemplo a solacongestidina (**70**)), iii) os **solanidanos** que são bases terciárias hexacíclicas com um anel indolizidina fundido (como exemplo a solanidina (**71**)), iv) o grupo **solanocapsina** com um fragmento α -epiminociclo-hemicetal invulgar (como exemplo a solanocapsina (**72**)) e v) os **3-amino-espirostanos**, um novo tipo de sapogeninas azotadas (como exemplo a jurubidina (**73**)).⁸⁵



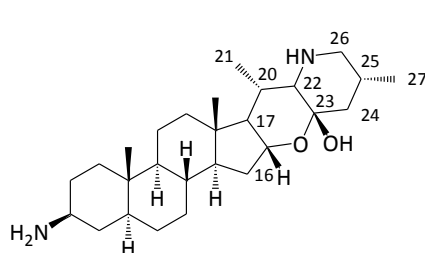
solasodina (**69**)



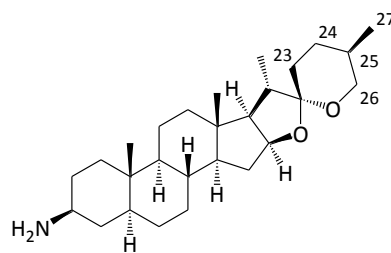
solacongestidina (**70**)



solanidina (**71**)



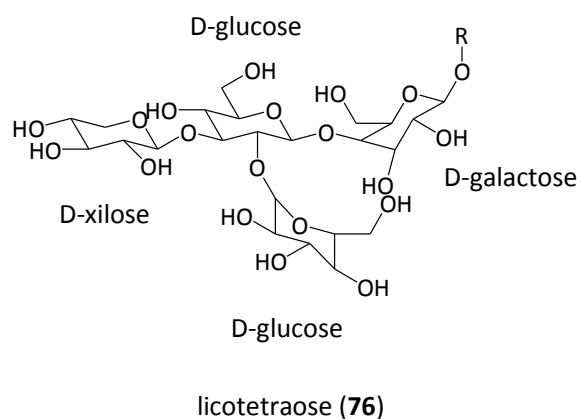
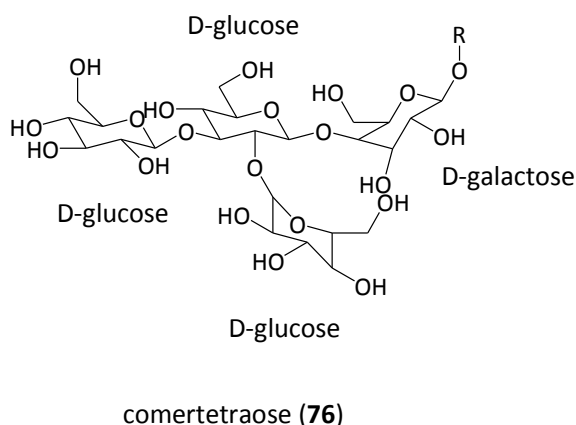
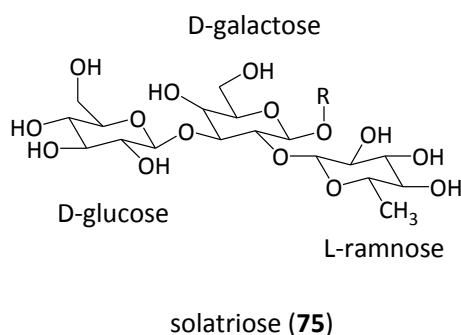
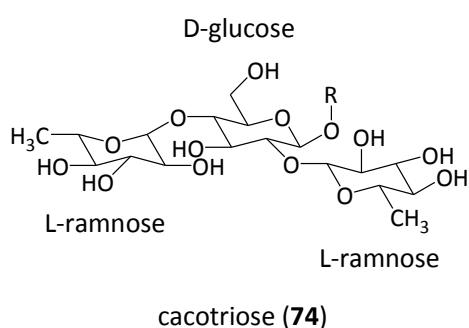
solanocapsina (**72**)



jurubidina (**73**)

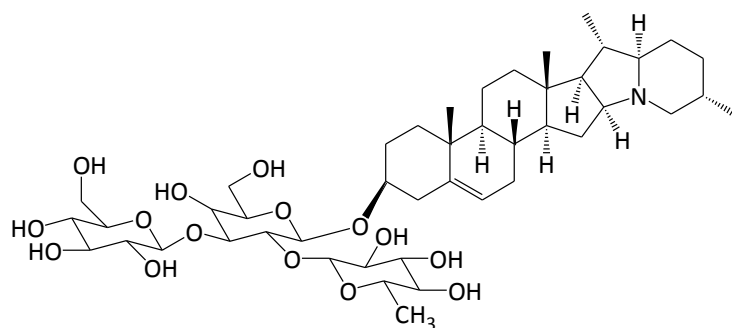
Ao contrário dos análogos de oxigênio, todos os compostos possuem a mesma estereoquímica em C-25, ficando o metilo sempre com uma orientação equatorial, enquanto que existem isômeros em C-22.⁵⁵

A segunda unidade estrutural dos glicoalcalóides é o fragmento glicosídico que consiste de diferentes combinações de D-glucose, D-galactose, D-xilose e L-ramnose na forma de tri-ou tetrassacáridos: a cacotriose (**74**), a solatriose (**75**), a comertetraose (**76**) e a licotetraose (**77**).

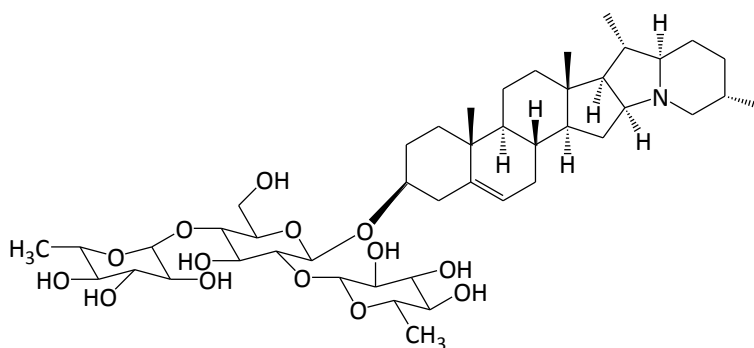


Foram isolados e caracterizados pelo menos 90 alcalóides estruturalmente diferentes em mais de 300 espécies de *Solanum*.⁸⁶ A maioria dos glicoalcalóides isolados de espécies de *Solanum* pertencem ao grupo dos solanidanos e dos espirosolanos.

A solanina foi o primeiro alcalóide a ser relatado como constituinte natural da batata em 1826 e em 1951 foi reconhecido como glicósido. Mas só em 1954 com o trabalho de Kuhn e Löw é que se demonstrou que o termo "solanina" era na realidade uma mistura da α -solanina (**78**) e da α -caconina (**79**), recém-descoberta.^{84,86}



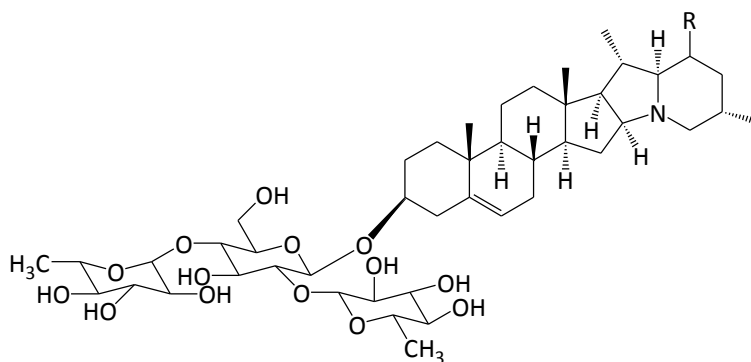
α -solanina (**78**)



α -caconina (**79**)

Sabe-se hoje que são os principais glicoalcalóides isolados em cultivares de *S. tuberosum* mas também se encontram presentes noutras espécies de *Solanum*.⁸⁴ Ambos os compostos possuem a mesma alcalina, a solanidina (**71**), mas diferem entre si no fragmento glicosídico ligado na posição 3. Enquanto que a α -solanina (**78**) possui uma unidade ramificada α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosil- β -galactopiranosil (solatriose (**75**)), a α -caconina (**79**) possui uma cadeia lateral ramificada bis- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosil (cacotriose (**74**)).

Um outro grupo de glicoalcalóides chamados de “leptinas” cujas alcalinas são derivadas da solanidina (**77**) por acetilação ou hidroxilação em C-23 e foram isolados principalmente da folha de *Solanum chacoense*. Nele incluem-se as leptinas que são derivados acetilados em C-23 como a leptina I (**80**) e as leptininas que são hidroxiladas na posição 23 como a leptinina I (**81**), possuindo ambos o mesmo fragmento glicosídico (a cacotriose (**74**)).⁸⁷



Leptina I (**80**) R= OAc

Leptinina I (**81**) R= OAc

Foram também relatadas novas estruturas de glicoalcalóides provenientes de plantas do género *Solanum* hibridizadas ou modificadas geneticamente.⁸⁴

A via biossintética dos glicoalcalóides esteroidais não foi ainda totalmente elucidada. É, no entanto, geralmente aceite que os glicoalcalóides esteroidais derivam de esteróis.⁸⁸ Na espécie *Solanum tuberosum* e noutras espécies de plantas, os produtos finais da via de biossíntese de esteróis incluem o colesterol, o campesterol e o sitosterol, que possuem funções importantes de regulação da fluidez e da permeabilidade de membranas.⁸⁹

O colesterol é um esteroide minoritário na maioria das espécies das plantas superiores mas ocorre a níveis elevados em plantas que sintetizam os glicoalcalóides esteroidais como *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum* e *S. melongena*. O colesterol não se acumula nas plantas mas é imediatamente e completamente convertido noutros metabolitos.⁹⁰ Heftmann veio propor o colesterol como o precursor mais provável na síntese de glicoalcalóides esteroidais mas a via exacta para a conversão do colesterol em glicoalcalóides não foi inteiramente esclarecida.⁸⁹

Propõe-se então que, na síntese de glicoalcalóides esteroidais, ocorre uma hidroxilação em C-26 para dar o 26-hidroxicolesterol seguida de uma reacção de transaminação que envolve a substituição do grupo hidroxilo em C-26 por um grupo amina oriundo de um aminoácido, a arginina.^{89,86} Uma reacção de hidroxilação em C-22 seguida de uma substituição nucleofílica permitem a ciclização de 26-amino-22-hidroxicolesterol gerando um anel de piperidina. Após a hidroxilação, a amina secundária é oxidada dando origem a uma imina e o sistema espiro é previsível como resultado de uma adição nucleofílica do hidroxilo 16 β na imina (ou no ião imínio

após protonação). Se se forma a configuração *22R* (como na solasodina (**69**)) ou a configuração *22S* depende desta reacção.⁵⁵

Uma variante da forma como a cadeia lateral do colesterol pode ser ciclizada é ilustrada pela estrutura da solanidina (**71**). Aqui, o sistema de anel indozilidina condensado parece ser formado por uma ramificação da via metabólica da solasodina e da tomatina. Em vez de ocorrer um ataque nucleofílico do hidroxilo à imina, parece ocorrer um processo de deslocamento nucleofílico do hidroxilo pela amina.⁵⁵

Apesar da via metabólica que conduz do colesterol à solanidina não ser totalmente conhecida, estudos genéticos e enzimáticos permitiram esclarecer o metabolismo posterior que envolve a introdução das cadeias glicosídicas. Na batata, sabe-se que os últimos passos que conduzem à α -solanina incluem a adição sequencial de moléculas de açúcar ao grupo hidroxilo em C-3 catalisada por três enzimas diferentes: a solanidine galactosiltransferase (SGT1), a glucosiltransferase (SGT2) e a ramnosiltransferase (SGT2). A SGT1 catalisa a formação de γ -solanina (Gal-solanidina), a SGT2 catalisa a formação de β -solanina (Glu-Gal-solanidina) e a SGT2 catalisa a síntese final de α -solanina.⁸⁹

Os glicoalcalóides exibem actividades anti-apoptóticas e efeitos quimiopreventivos.⁸⁴ A avaliação da actividade citotóxica de vinte glicoalcalóides isolados de plantas do género *Solanum* para as linhas celulares de cancro do pulmão (PC-6), da mama (MCF-7), do estômago (NUGC-3), de leucemia (P388) e de cólon (SW620) permitiu concluir que o fragmento glicosídico desempenhava uma função importante na actividade citotóxica sendo o fragmento β -cacotriosilo mais eficiente do que o β -solatriosilo. Os glucosídeos ramnosil-(1-2) são mais eficientes do que os ramnosil-(1-4). De entre os derivados das estruturas furostano, espirostano, espirosolano e solanidano, os glicosídeos derivados do espirostano são os mais eficientes para todas as linhas de células. A actividade foi diminuindo segundo a ordem solanidano, furostano, espirosolano.⁹¹

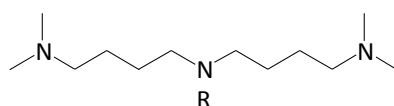
Foi também relatada actividade antiviral da α -caconina (**79**) para o vírus Herpes simplex. Observou-se que as alcaminas esteroidais correspondentes eram inactivas, o que sugere que a presença de açúcar é essencial à actividade antiviral.⁹² A actividade antifúngica da α -solanina (**78**) e da α -caconina (**79**) para os fungos *Alternaria brassicicola*, *Phoma medicaginis*, *Ascobulus crenulatus* e *Rhizictonia solani* foi igualmente descrita.⁸⁴

Para além das propriedades farmacológicas, pensa-se que muitos destes compostos glicosilados estão envolvidos em funções de defesa química para manter os predadores afastados. Apesar de não serem metabolitos necessários ao desenvolvimento e metabolismo das plantas superiores, têm sido associados à resistência das plantas a pestes e ataques por agentes patogénicos desde 1950.

Apesar de não ter sido relatada a toxicidade dos glicoalcalóides presentes no tomate ou beringela para o Homem, foi relatada a toxicidade dos glicoalcalóides presentes no tubérculo da espécie de *Solanum tuberosum* foi amplamente descrita os quais podem provocar dores de cabeça, vômitos, diarreia, apatia, agitação, sonolência, confusão mental, tremuras, alucinações, entre outros.⁸⁴ Foi igualmente descrita actividade teratogénica e embriotóxica.⁹³ Por isso, os regulamentos de segurança estabelecem um limite do seu teor para 20 mg/100 g de peso fresco.

I.1.8 Outros alcalóides

As *N*-aciltriأمينas solapalmitine (**82**), solapalmitidine (**83**), solamina (**84**), solacoproina (**85**) e solauretina (**86**) são exemplos de outros alcalóides isolados de *Solanum* que não se incluem nos grupos anteriores. Os compostos **82** e **83** apresentam actividade antitumoral *in vitro* para as linhas celulares do carcinoma nasofaríngeo (KB) e *in vivo* para o carcinoma Walker 256 em ratos.⁹⁴



solapalmitina (**82**) R= CO(CH₂)₁₄CH₃

solapalmitenina (**83**) R= COC=C(CH₂)₁₂CH₃

solamina (**84**) R=H

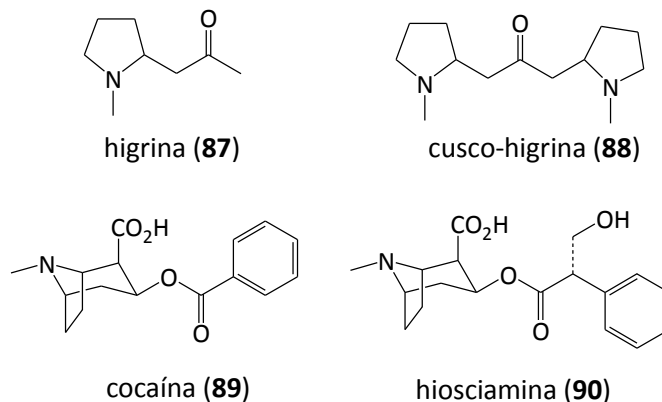
solacoproina (**85**) R=CO(CH₂)₄CH₃

solauretina (**86**) R=COOCH₂CH₃

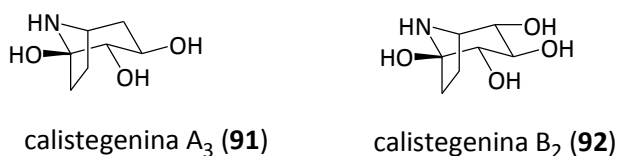
Por estudos de SAR (*Structure Activity Relationships*) concluiu-se ser fundamental uma cadeia de pelo menos doze átomos de carbono para haver citotoxicidade.⁹⁵ Tal foi reforçado pela falta de actividade manifestada pela solamina (**84**).⁹⁶

Introdução

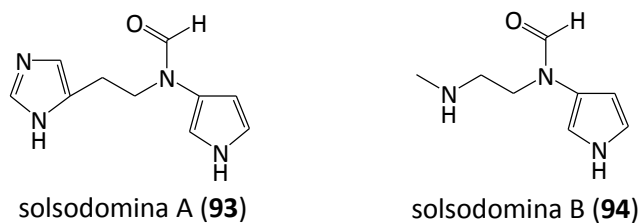
Foram também isolados os alcalóides com estruturas de pirrolidina simples como a higrina (**87**) e a cusco-higrina (**88**)⁹⁶ e alcalóides com um anel de tropano como a cocaína (**89**) e a hiosciamina (**90**) com elevado valor farmacológico em espécies da família das *Solanaceae*.⁵⁵



As calistegeninas são um grupo de derivados poli-hidroxilados de *nortropano*, solúveis em água, que foram isolados de folhas e raízes de muitas plantas da família das *Solanaceae* incluindo as plantas do género *Solanum*.⁹⁷ Estes compostos como a calistegenina A₃ (**91**) e B₂ (**92**) possuem um grande interesse como inibidores da glucosidase tendo potencial para originar fármacos com actividade anti-HIV.⁵⁵



Foram também identificados na espécie *Solanum sodomaeum* dois alcalóides pirrólicos a solsodolina A (**93**) e a solsodolina B (**94**). A solsodolina A (**97**) apresenta uma actividade moderada para *Mycobacterium intracellulare*.⁹⁸

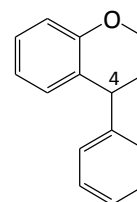
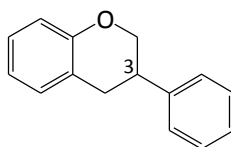
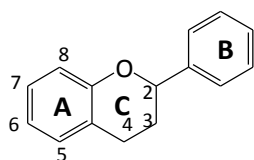


I.1.9 Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de metabolitos secundários que ocorrem em todas as plantas superiores os quais foram isolados e/ou identificados frequentemente em plantas da espécie *Solanum*.

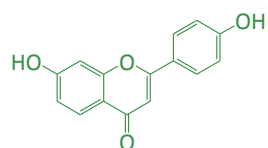
I.1.9.1 Estrutura

Os flavonóides possuem estrutura carbonada $C_6-C_3-C_6$ ou mais especificamente uma funcionalidade de fenilbenzopirano. Dependendo da posição da ligação do anel aromático B ao benzopirano (cromano), este grupo de produtos naturais pode ser dividido em três classes: os flavonóides (2-fenilbenzopiranos), os isoflavonóides (3-fenilbenzopiranos) e os neoflavonóides (4-fenilbenzopiranos).⁹⁹

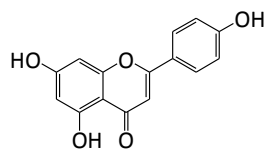


Estes compostos diferem também no grau de oxidação e saturação do heterociclo C. A grande diversidade de compostos deste grupo resulta de reacções de hidroxilação, metoxilação, *O*-glicosilação e *C*-glicosilação.¹⁰⁰ Em muitos casos surgem compostos com grupos alquilo (em geral prenilo) e também com anéis condensados com a estrutura base. Os derivados glicosídicos encontram-se muitas vezes acilados. A multiplicidade de modificações possíveis da estrutura base dos flavonóides resulta num grupo crescente com mais de 6000 compostos.

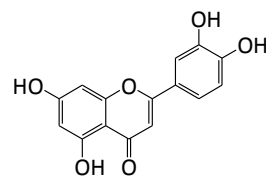
Introdução



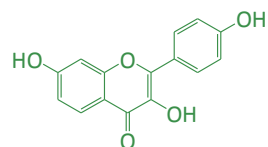
flavonas



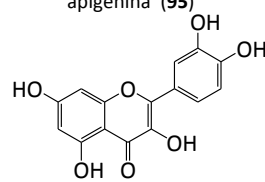
apigenina (95)



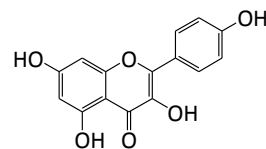
luteolina (96)



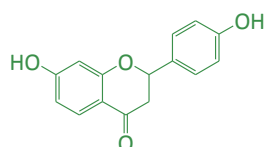
flavonóis



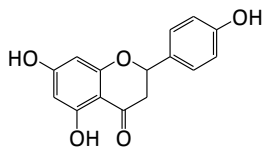
quercetina (97)



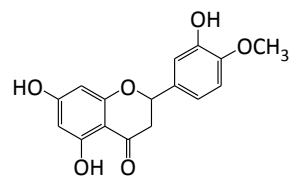
canferol (98)



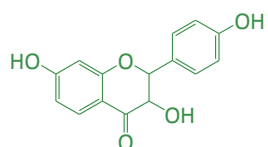
flavanonas



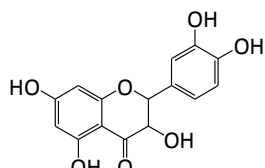
naringenina (99)



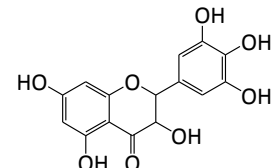
hesperitina (100)



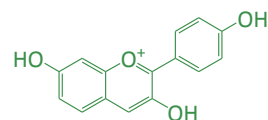
flavanóis ou catequinas



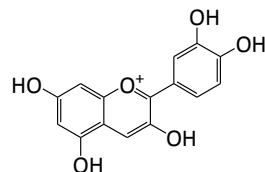
epicatequina (101)



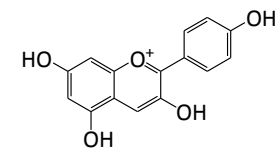
galocatequina (102)



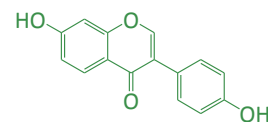
antocianidina



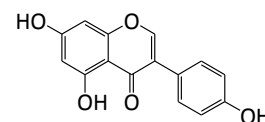
cianidina (103)



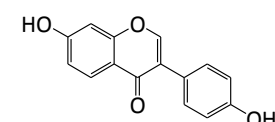
pelargonidina (104)



isoflavonas



genisteína (105)



daidzeína (106)

As seis subclasses principais dos flavonóides incluem as flavonas (ex: a apigenina (95) e a luteolina (96)), os flavonóis (ex: a quercetina (97) e o canferol (98)), as flavanonas (ex: a naringenina (99) e a hesperitina (100)), os flavanois ou catequinas (ex: epicatequina (101) e galocatequina (102)), antocianidinas (ex: a cianidina (103) e a pelargonidina (104)) e as isoflavonas (ex: genisteína (105) e a daidezina (106)).¹⁰¹

A presença de flavonóides em plantas da família das Solanaceae profundamente estudada.¹⁰² Harborne *et al.* isolaram, em 1960, os flavonóis canferol, quercetina e miricetina de tubérculos e flores de vários cultivares de espécies de *Solanum tuberosum*. Foi também investigada a presença de flavonóides nas folhas de 107 espécies de *S. tuberosum* por Wietschel e Reznick tendo sido identificados 38 flavonóis glicosilados diferentes e uma flavona (isoramnetina)-glicosilada.^{103,104}

Foi realizado um estudo de algumas espécies dos géneros *Nicotiana* e *Solanum* pertencentes à família das Solanaceae mostrou que, apesar da grande diversidade morfológica das plantas desta família, apenas um número limitado de flavonóides era extraído dos exsudados.¹⁰⁵

De acordo com um estudo realizado por Silva *et al.* a maioria dos flavonóides isolados e identificados de plantas do género *Solanum* são derivados do canferol (**98**) e da quercetina (**97**) ou dos seus derivados metilados e acilados.¹⁰⁶ A glicose e a ramnose surgem como os fragmentos glicosídicos mais comuns enquanto a galactose, a arabinose e a xilose surgem com menos frequência.

Foram isolados e identificados da espécie *Solanum cernuum* os flavonóides glicosilados quercitrina (**1**) e afzelina (**2**) como foi referido no início da introdução.¹⁵

I.1.9.2 Biossíntese

A biossíntese dos flavonóides inicia-se com a condensação de uma unidade de *p*-cumaroil-CoA com três moléculas derivadas de poliacetato, catalisada pela chalcona sintase, originando uma cadeia de poliacetato a qual pode ciclisar de duas formas diferentes. Uma delas permite uma condensação de Claisen formando calconas que são os precursores de flavonóides que se encontram em todo o reino vegetal.

A maioria dos flavonóides possuem um anel heterocíclico de 6 membros o qual se forma após o ataque nucleofílico do fenol à cetona α,β -insaturada para dar uma flavanona (como a naringenina (**99**)). As flavanonas podem então dar origem a muitas variantes da sua estrutura básica: as flavonas, os flavonóis, as antocianinas e as catequinas. As reacções de hidroxilação em qualquer um dos dois anéis aromáticos que ocorre em geral na fase de flavanona para além das

reações de metilação, glicosilação que são também possíveis vêm aumentar a gama de flavonoides que ocorrem.

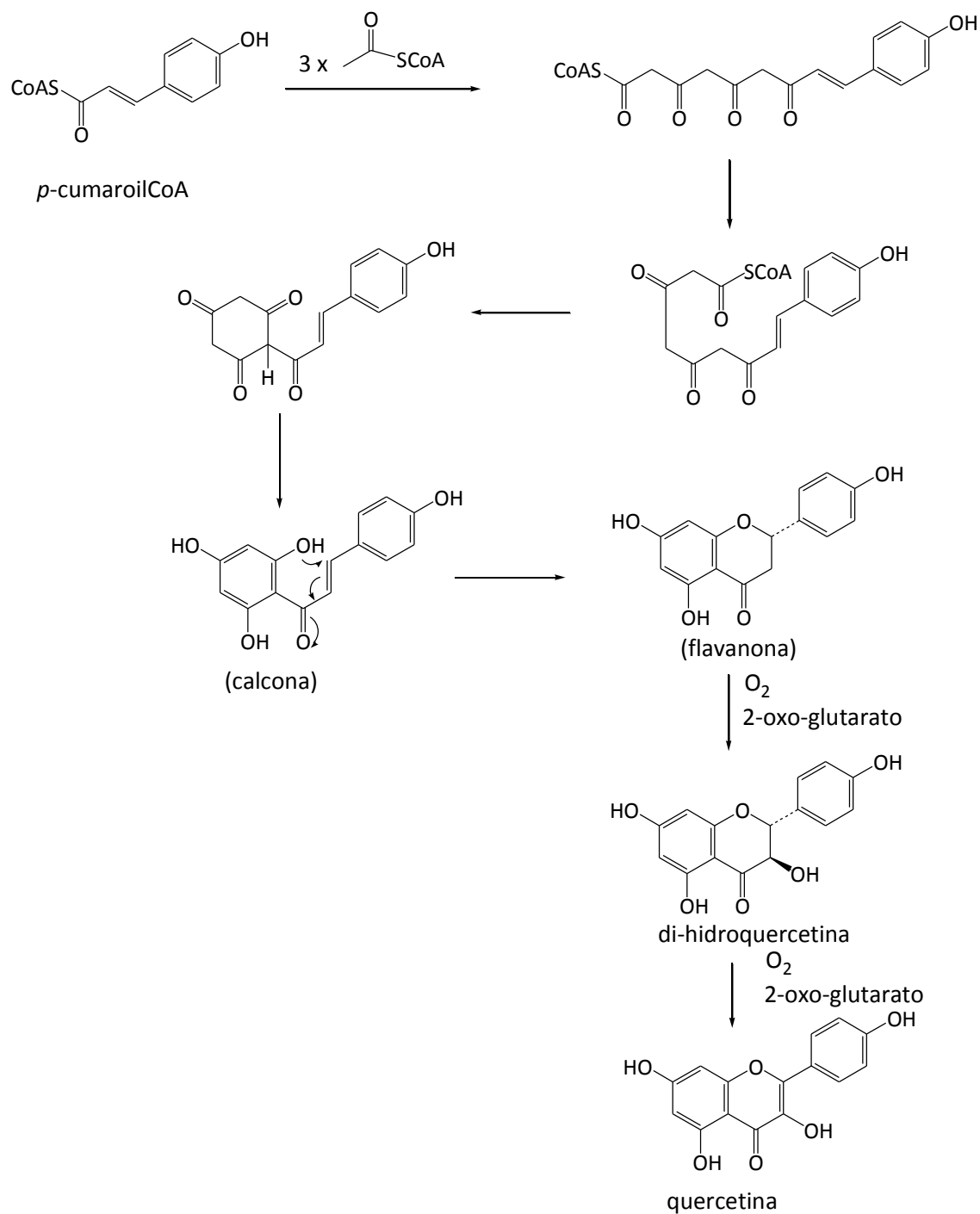


Figura I.1.7 Biossíntese da quercetina (97).

A maioria dos sistemas enzimáticos apresenta uma reduzida especificidade podendo catalisar reacções de compostos com diferentes graus de oxigenação.

I.1.9.3 Actividade Biológica

Um fenómeno importante que influenciou o interesse crescente na química dos flavonóides foi o “paradoxo Francês”. Este fenómeno refere-se à França, país em que a taxa de mortalidade devida à doença coronária cardíaca é muito mais baixa do que a dos outros países industrializados apesar do consumo de gorduras saturadas e dos níveis de colesterol no soro serem idênticos aos dos outros países.¹⁰⁷ O fenómeno foi explicado por Hertog *et al.* em 1993 num artigo com grande divulgação.¹⁰⁸ Segundo estes autores, este fenómeno podia ser explicado pela presença de compostos fenólicos antioxidantes no vinho tinto cujo teor apresenta uma correlação inversa com a mortalidade devida à doença coronária cardíaca.

Ao mesmo tempo foi demonstrado que os alimentos derivados de plantas que já tinham sido considerados saudáveis possuíam elevados níveis de flavonóides. Foram realizados estudos epidemiológicos nos quais foi investigada a relação entre a ingestão de flavonóides e o efeito na doença coronária cardíaca e na mortalidade por cancro. Para além das doenças cardiovasculares e de certas formas de cancro pensa-se que eles actuam como antioxidantes destruindo os radicais livres prejudiciais. A quercetina (**97**) é um antioxidante poderoso, capaz de quelar metais, destruir radicais e prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade.⁵⁵

Sabe-se também que os flavonóides são sintetizados pelas plantas como resposta à infecção microbiana. Por isso não é de estranhar que eles tenham apresentado actividades antimicrobianas significativas para uma ampla gama de microorganismos.¹⁰⁹ A maioria dos resultados descritos referem-se às actividades antifúngica e antibacteriana mas foram também descritos estudos relativos à actividade antiviral.¹¹⁰

Os resultados dos estudos SAR dos flavonóides têm sido contraditórios e não conclusivos. Foi demonstrado que os compostos menos polares *i.e.* os flavonóides que não possuem grupos hidroxilo no anel B são mais activos para os microorganismos do que os compostos com grupos – OH. Estas conclusões foram confirmadas pela observação de que a metilação do núcleo flavonóide

resultava num aumento da actividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*. No caso de *S.aureus* resistentes à metilina, a presença de cadeias alifáticas no anel da flavona (6 ou 8) torna a molécula mais lipofílica e com uma actividade acrescida relativamente às flavonas não substituídas.¹⁰⁷

Foi também demonstrado no caso das bactérias cariogénicas (*Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* e alguns *Streptococci*) que a presença de vários grupos hidroxilo nos anéis A e B , garantindo a presença do grupo hidroxilo na posição 5, e de uma cadeia alifática no anel A são determinantes na actividade antibacteriana das flavonas. No entanto, foi afirmado que os flavonóides metoxilados, lipofílicos não são bons protectores contra os microorganismos. Esta afirmação foi confirmada pelo facto dos glicosídeos da quercetina apresentarem uma actividade antimicrobiana importante para vários microorganismos.¹¹¹

Resumindo, podemos afirmar que durante a década de 90 se observou que os flavonóides exerciam uma ampla gama de efeitos biológicos, muitos dos quais estavam relacionados com a saúde do Homem.¹¹² Uma vez que a diversidade estrutural apresentada pelos produtos naturais é superior à dos compostos obtidos por síntese, é natural que se continue na busca, no reino vegetal, de novos compostos desta família que possuam actividades biológicas superiores às dos compostos conhecidos e que se testem os compostos conhecidos para actividades biológicas diferentes.

Para além da procura de novas moléculas candidatas a utilização farmacológica, também é importante a investigação da composição e actividade de extractos brutos das plantas utilizadas na medicina tradicional ou com valor nutricional. O resultado pode ser não a obtenção de um novo fármaco mas a obtenção de um extracto processado a ser introduzido na indústria alimentar ou uma directriz para um consumo de alimentos mais adequado.¹⁰⁷

Capítulo I.2

Estudo fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

I.2.1

A medicina tradicional continua na linha da frente da farmacoterapia de muitos milhões de pessoas do mundo inteiro em especial nos países em via de desenvolvimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que cerca de 65% da população mundial utiliza os extractos medicinais derivados de plantas como cuidados de saúde primários. Para isso contribuem grandemente a ampla biodiversidade, a elevada disponibilidade de plantas medicinais e uma longa tradição associada à sua utilização.¹¹³

Apesar da sua aplicação ser encarada com algum cepticismo pela medicina ocidental, os extractos medicinais utilizados nas tradições médicas antigas tais como a medicina ayurvédica indiana e a medicina tradicional chinesa podem constituir uma fonte rica de modelos terapêuticos para a indústria farmacêutica.

A ideia de transformar os componentes das medicinas tradicionais em fármacos modernos tem a sua origem nos exemplos da quinina para a malária e da aspirina (ácido acetilsalicílico) antipirética e analgésica. O alcalóide quinina, que foi isolado em 1820 da casca de algumas espécies de *Cinchona*, foi utilizado pelos índios peruanos para suprimir as tremuras e tem sido utilizado no tratamento da malária desde o século XVII. A aspirina é um derivado do ácido salicílico isolado da casca do salgueiro (espécie *Salix*) utilizado, desde há muito, para tratar a febre e a inflamação em muitas culturas em todo o mundo. O sucesso destes fármacos conduziu à busca de novos fármacos tendo como base os conhecimentos das medicinas tradicionais.¹¹³

Os compostos que constituem os extractos medicinais são de grande interesse pois são normalmente moléculas com estruturas que possuem múltiplos grupos funcionais e são estereoquimicamente complexas, de difícil síntese química e com propriedades biológicas interessantes. E, sobretudo, os extractos de onde provêm foram já “cl clinicamente” testados, nalguns casos há milénios, na medicina tradicional.¹¹³

Apesar do progresso notável efectuado no desenvolvimento de novas terapias, o cancro permanece como uma grande ameaça da saúde pública. Estima-se que o número de mortes relacionadas com o cancro duplique nos próximos 50 anos. Uma vez que muitos cancros são evitáveis, a estratégia de controle do cancro envolve uma mudança de paradigma de quimioterapia para quimioprevenção. A quimioprevenção envolve o uso de substâncias químicas não tóxicas de origem

natural ou sintética que previnem a carcinogénese quer por estímulo da desintoxicação dos agentes cancerígenos e dos seus metabolitos reactivos ou pondo fim, atrasando ou revertendo a proliferação e a transformação maligna subsequente das células danificadas.⁴⁵

As plantas do género *Solanum* (família das Solanaceae) são utilizadas num elevado número de culturas devido não só ao seu valor nutricional mas às propriedades medicinais. A espécie *Solanum cernuum* Vell. é uma planta medicinal brasileira utilizada no tratamento de uma grande variedade de doenças maioritariamente de origem inflamatória, infecciosa e tumoral, tal como foi referido na introdução.

Neste trabalho procedeu-se à extracção da planta *Solanum cernuum* Vell. com diclorometano e etanol, à avaliação da actividade biológica e farmacológica dos extractos, seguida do fraccionamento orientado de acordo com os resultados dessa avaliação. Esta avaliação teve como objectivo testar as propriedades bioactivas dos extractos de diclorometano e de etanol para potenciais aplicações que justificassem o isolamento e identificação estrutural dos seus constituintes.

1.2.2 Extracção

Após a colheita da planta ela foi seca em condições controladas e extraída sucessivamente com diclorometano e etanol tendo sido obtidos o extracto de diclorometano (EBD) e de etanol (EBE). A escolha de diclorometano que extrai preferencialmente compostos mais lipófilos e de etanol para a extracção de compostos mais polares assegura a extracção de compostos com uma gama ampla de polaridades.

1.2.3 Avaliação da actividade biológica dos extractos EBD e EBE

Sabendo que a inflamação local e persistente de um tecido é um factor comum ao processo da carcinogénese e dentro de uma abordagem de quimioprevenção, foi testada a actividade anti-inflamatória dos extractos. Foram também realizados ensaios da actividade anti-ulcerosa e da actividade antibacteriana.

I.2.3.1 Actividade anti-inflamatória

Ensaio de edema de orelha

Com o objectivo de detectar o potencial anti-inflamatório de ligandos da histamina presentes nos extractos de diclorometano (**EBD**) e de etanol (**EBE**), foi realizado o ensaio de edema de orelha induzido pela aplicação local de óleo de croton (2,5 %) utilizando o fármaco anti-inflamatório dexametasona (0,4%) e acetona como controle.

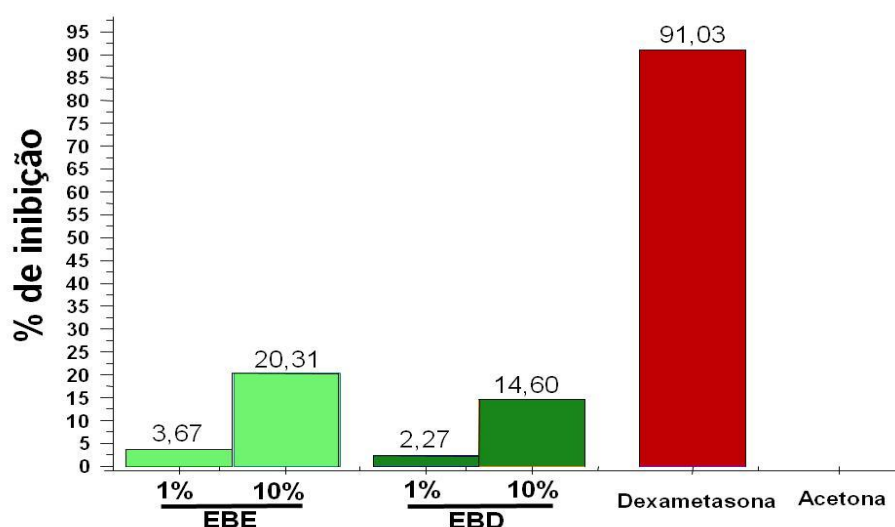


Figura I.2.1 Efeito do tratamento com extracto etanólico - **EBE** (1% e 10%) e de diclorometano – **EBD** (1% e 10%) de *Solanum cernuum* Vell, dexametasona (0,4%), acetona (controle negativo) no ensaio do edema de orelha induzido em ratos por óleo de croton a 2,5%. Anova EBE $F(3,19)=p<0,0001$; EBD $F(3,23)=p<0,0001$ em relação ao grupo controle. Teste Tukey Kramer $p<0,05$.

Analisando os resultados apresentados na figura I.2.1 pode observar-se que apenas a solução de extracto etanólico (10%) apresentou uma actividade moderada correspondente a uma inibição de 20,3%.

Modelo da contorção induzida por ácido acético

O modelo da contorção induzida pelo ácido acético é um ensaio de estímulos adequado a avaliar a actividade anti-inflamatória e/ou analgésica uma vez que a intensidade da resposta depende da interacção de vários factores (neurotransmissores/neuromoduladores) que determinam a nocicepção (envio de um sinal, por um receptor sensorial, o nociceptor, o qual causa a percepção da dor em resposta a um estímulo que possui um dano potencial).¹¹⁴ Por isso, este modelo permite a

Discussão de Resultados

avaliação da actividade anti-nociceptiva produzida pela dor inflamatória e/ou neurogénica e a resposta a substâncias analgésicas por uma grande variedade de mecanismos, sendo sensível a fármacos como antagonistas dos receptores da quinina, analgésicos opióides e ao ácido acetilsalicílico.^{115,116}

Na Figura 1.2.2 é apresentado o efeito do tratamento dos ratos com diferentes doses do extracto etanólico **EBE** (300 e 600 mg/Kg) e com diferentes doses de extracto de diclorometano **EBD** (100, 300 e 600 mg/Kg).

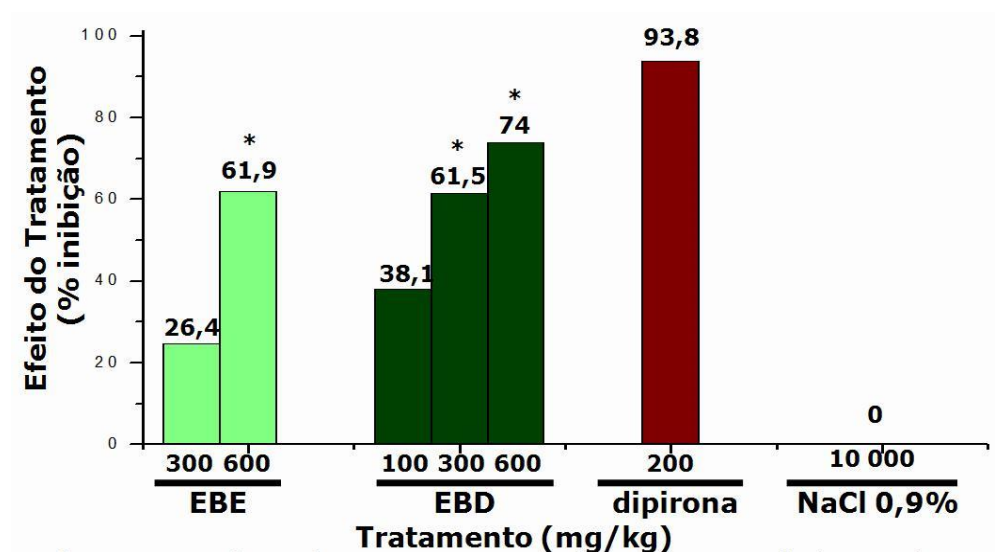


Figura 1.2.2 Efeito do tratamento com o extracto etanólico – EBE (300mg/kg e 600mg/kg), o extracto de diclorometano – EBD (100 mg/kg, 300 mg/kg e 600 mg/kg) de *Solanum cernuum* Vell, a dipirone (200mg/kg) e uma solução de NaCl 0,9% (controle negativo) no ensaio de contorção abdominal induzida em ratos pelo ácido acético a 0,8%. Anova F (6,34)=p< 0,0001. Test Tukey Kramer * p<0,05.

A análise dos resultados apresentados na Figura 1.2.2 permitiu concluir que, no modelo da contorção induzida por ácido acético a 0,8 %, os dois extractos apresentaram um efeito de inibição das contorções significativo dependente da dose. De entre eles, o efeito inibidor do extracto de diclorometano (**EBD**) foi mais significativo atingindo um valor de 38,1% para uma dose de 100 mg/Kg, tendo sido observadas uma redução de 61,5% (p<0,05) para a dose de 300 mg/Kg e uma redução de 74% (p<0,001) para a dose de 600 mg/Kg.

I.2.3.2 Atividade anti-ulcerosa

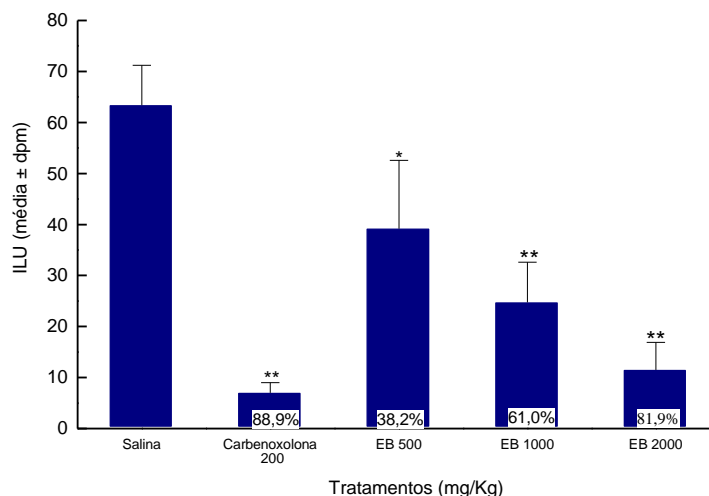
A utilização das infusões das folhas da espécie vegetal *Solanum cernuum* Vell. no tratamento de úlceras gástricas na medicina tradicional e a actividade anti-ulcerosa significativa do extracto etanólico observada por Araújo *et al.*¹³ levou a investigar a actividade anti-ulcerosa do extracto de diclorometano. Foram realizados dois ensaios modelo nos quais a indução de lesões agudas da mucosa gástrica foi realizada com uma solução de etanol (95%) (ensaio modelo 1) e com indometacina (ensaio modelo 2).

A úlcera gástrica ocorre quando uma agressão ou a diminuição na resistência da mucosa altera o equilíbrio fisiológico entre as barreiras de protecção e os factores ulcerogénicos. Estes incluem o aumento da secreção de ácido clorídrico, a redução da neutralização realizada pelo bicarbonato, a diminuição da secreção de muco, a redução da síntese de prostaglandinas e óxido nítrico e a presença da bactéria *Helicobacter pylori*.¹³

A administração de etanol absoluto a ratos produz lesões na mucosa gástrica e erosões idênticas às que ocorrem na úlcera gástrica.¹¹⁷ Pensa-se que o dano no tecido induzido na mucosa gastrointestinal devida à toxicidade aguda do etanol pode estar associado com a ocorrência da peroxidação lipídica e com a geração de espécies reactivas tóxicas que originam um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante. Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente ocorre uma acumulação de radicais livres que provoca lesões na membrana celular, danos oxidativos e morte celular caso a agressão continue.¹¹⁸ Outra proposta para explicar o dano oxidativo induzido pelo etanol à mucosa gástrica baseia-se no efeito constritivo em veias e artérias da mucosa gástrica originando a congestão, inflamação e danos nos tecidos. Para Mizui e Doteuchi o modelo de indução por etanol avalia a actividade das substâncias citoprotectoras dos extractos ou compostos.¹¹⁹ As plantas têm sido reconhecidas como fontes de antioxidantes que podem proteger do *stress* oxidativo e desempenhar uma função importante na quimioprevenção de doenças que resultam da peroxidação lipídica.¹²⁰

No ensaio modelo 1, observou-se que os índices de lesões observados após tratamento com **EBD** de 500, 1000 e 2000 mg/Kg/*po* foram 38,2%, 61,0% e 81,9% enquanto que a carbenoxolona (200 mg/kg) inibiu 88,9 %. Esta actividade suave do **EBD** observada pode ser explicada por uma actuação como efeito protector ou como estimulante da actividade antioxidante (Figura I.2.3).

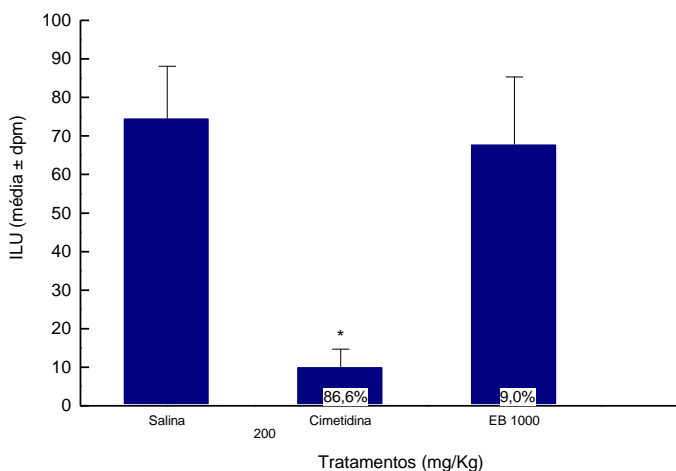
Discussão de Resultados



ANOVA $F_{(4,22)} = 19,95$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$.

Figura I.2.3 Índice de lesões ulcerosas ULI (Mean \pm SEM) obtidos com diferentes doses de extracto de diclorometano de *Solanum cernuum* (solução salina, 0.9% NaCl) e carbenoxolona (200mg/Kg) no modelo de etanol. Foram utilizados o método ANOVA e o teste de Dunnett para comparação, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$), (n=6). ANOVA $F_{(4,22)} = 19,95$, $p < 0,001$. Ensaio Duncan, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

Por outro lado, no ensaio modelo 2, as lesões na mucosa gástrica foram provocadas pela indometacina que é um inibidor potente da ciclo-oxigenase e, como consequência, da biossíntese das prostaglandinas provocando a diminuição da resistência da mucosa à acção do ácido clorídrico e da pepsina.¹³ Ao contrário da actividade anti-ulcerosa significativa apresentada pelo extracto etanólico observada por Araújo *et al.*¹³ o extracto **EBD** na úlcera gástrica induzida pela indometacina (40 mg/Kg) não apresentou actividade (Figura I.2.4).



ANOVA $F_{(2,13)} = 34,69$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$.

Figura I.2.4 Índice de lesões ulcerativas ULI (Mean \pm SEM) obtidos com o extracto de diclorometano de *Solanum cernuum* Vell. (solução salina, 0.9% NaCl) e cimetidina (200mg/Kg) no modelo de indometacina. Foram utilizados o método ANOVA e o teste de Dunnett para comparação, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$), (n=6). ANOVA $F_{(2,13)} = 34,69$, $p < 0,001$. Ensaio Duncan * $p < 0,01$.

Como conclusão, pode dizer-se que os metabolitos presentes no extracto de diclorometano não podem contribuir para o efeito antiulcerogénico observado para a planta *Solanum cernuum* Vell. na medicina tradicional.

12.3.3 Atividade antibacteriana

A actividade antibacteriana dos extractos **EBD** e do **EBE** foi testada *in vitro* em estirpes de bactérias patogénicas do homem Gram- (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*) e em estirpes de bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 1.2.1 pode observar-se que o extracto de diclorometano (**EBD**) apresentou actividade para quatro estirpes de bactérias Gram+ com valores de concentrações bactericidas mínimas (MBC) compreendidas no intervalo de 0,6-10,0 mg/mL. O extracto etanólico (**EBE**) também foi activo para as bactérias *Staphylococcus epidermis* e *Bacillus cereus* com valores de MBC de 1,25 e 2,50 mg/mL, respectivamente.

Tabela 1.2.1 Valores da concentração bactericida mínima (mgmL⁻¹) do extracto de diclorometano (**EBD**) e do extracto etanólico (**EBE**) de *Solanum cernuum* Vell. para diferentes bactérias

Bactérias	Extractos		Controle		
	EBD	EBE	Fu	Va	Ac.Na
<i>Escherichia coli</i>	-	-	0,01	-	0,1
<i>Salmonella enterica</i>	-	-	0,01	-	0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	--	-	0,1
<i>Helicobacter pylori</i>	30	30	0,01	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	-	0,001	0,001	-
<i>Staphylococcus epidermis</i>	1,25	1,25	0,001	0,01	-
<i>Bacillus cereus</i>	5	2,5	0,01	0,05	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,6	-	0,10	0,05	-

(-)-não foi determinado o valor de MBC na gama de concentração testada; Fu-Furazolidona; Va-vancomicina, Ac.Na-Ácido Nalidíxico. Os resultados são valores coincidentes com pelo menos dois ensaios.

Tanto o extracto **EBD** como o extracto **EBE** apresentaram actividade para a bactéria *Helicobacter pylori* com uma concentração bactericida mínima de 30 mg/mL.

Pode dizer-se que a avaliação da actividade biológica dos extractos de diclorometano e etanólico da planta *Solanum cernuum* Vell. revelou que eles possuíam actividade anti-inflamatória,

actividade antibacteriana e actividade anti-ulcerosa o que justificou o fraccionamento, a elucidação estrutural e a avaliação da actividade biológica dos compostos isolados de ambos os extractos.

I.2.4. Fraccionamento dos extractos EBD e EBE

Procedeu-se à separação do extracto de diclorometano (**EBD**) por cromatografia de coluna em sílica gel 60, desactivada com água a 10 % (*n*-hexano/acetato de etilo 9/1 (V/V)) tendo sido recolhidas várias fracções de polaridade crescente.

A fracção eluída com *n*-hexano era composta por uma série de alcanos de cadeia longa (C₂₅-C₃₄).¹²¹ A partir da fracção eluída com *n*-hexano/acetato de etilo (9:1), constituída por uma mistura de triterpenos, foram obtidos após sucessivas cromatografias de coluna e de placa (como está descrito na Parte Experimental) a cicloeucalenona (**24**) (2,80 g; 7,0%), a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) (589 mg; 1,47%), (+)-24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (**108**) (20 mg; 0,05%) e o β -sitosterol (146 mg; 0,36%). Da fracção eluída com *n*-hexano/acetato de etilo (7:3), rica em carotenóides, foi isolada a luteína (380 mg; 0,95%).¹²²

Procedeu-se à purificação do extrato etanólico (**EBE**) por cromatografia de filtração por gel utilizando como fase estacionária o gel de Sephadex LH-20 e como fase móvel o metanol tendo sido recolhidas seis fracções. De uma das fracções (fracção **D**), que era constituída por uma mistura de amidas dos ácidos hidroxicinâmicos, foram obtidas após várias separações por cromatografia de coluna de fase reversa (conforme referido na Parte Experimental) a cernumidina (**109**) (86,3 mg; 1,92%), a isocernumidina (**110**) (11,1 mg; 0,25%), a cernumidina B (**111**) (23,9 mg; 0,53%) e a isocernumidina B (**112**) (10,4 mg; 0,23%). Da fracção seguinte (fracção **E**) que era rica em compostos fenólicos foram isoladas, por sucessivas cromatografias de fase reversa como se refere na Parte Experimental, a quercitrina (**1**) (18,9 mg; 0,42%), a afzelina (**2**) (6,0 mg; 0,13%), a hiperina (**113**) (7,0 mg; 0,14%), o ácido ferúlico (**114**) (3,3 mg; 0,07%) e a N-acetildopamina (**115**) (23,4 mg; 0,52%).

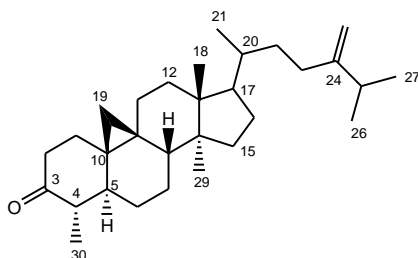
I.2.5 Elucidação estrutural

I.2.5.1 Elucidação estrutural dos triterpenos

Foram isolados três triterpenos com esqueleto de 31-norcicloartanona cujos nomes triviais são (+)-cicloeucalenona (**24**), (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e (+)-24-(1,3-dioxetano)-31-

norcicloartanona (**108**). Os três compostos possuem o mesmo núcleo tetracíclico de 31-norcicloartanona diferindo na substituição que apresentam na cadeia lateral.

(+)-Cicloeucalenona [24-metil-31-norcicloart-24(28)-en-3-ona]



24

O triterpeno maioritário do extracto de diclorometano é a cicloeucalenona (**24**) isolada da fracção **B3**, que possui funcionalidade 3-oxo- $\Delta^{24(28)}$. Este composto já tinha sido obtido por oxidação do cicloeucalenol¹²³ e isolado da pele do fruto *Musa sapientum* L. (*Musaceae*).¹²⁴ Mais tarde, foi relatada a identificação de um epímero em C-4.¹²⁵ A cicloeucalenona foi também isolada de um fungo não identificado colhido em New Jersey¹²⁶ e de *Tinospora crispa* (Menispermaceae).⁶⁰

A estrutura **24** foi identificada por comparação com os dados espectroscópicos^{127,128,129} e o sinal da rotação óptica específica da literatura.¹²³ As atribuições dos sinais dos espectros de ¹³C RMN basearam-se em experiências de DEPT, HMQC e HMBC.

A (+)-cicloeucalenona (**24**) foi revelada, em placa de TLC de sílica gel 60, após pulverização com solução de ácido molibdofosfórico o que sugere a presença de unidades carbonadas saturadas na estrutura.

O espectro de massa de **24** apresenta um sinal correspondente ao ião molecular $[M]^+$ a m/z 424 u.m.a. e um padrão de fragmentação análogo ao descrito para a cicloeucalenona¹³⁰ apresentando iões fragmento m/z 409 $[M-CH_3]^+$, 381 $[M-C_3H_7]^+$, m/z 340 $[M-C_5H_{10}O$ (rearranjo de McLafferty)]⁺, m/z 300 $[M-C_8H_{12}O]^+$, m/z 299 $[M-C_9H_{17}$ (cadeia lateral)]⁺, m/z 257 $[M-(C_9H_{17}$ (cadeia lateral)- C_3H_6 (carbonos C-15, C-16 e C-17 do anel D)]⁺ e m/z 243 $[M-(C_9H_{17}-C_3H_6-CH_2)]^+$.^{125,131,132,133, 134}

À semelhança do que foi descrito para a 31-norciclodaudenona,¹³⁰ um outro triterpeno com esqueleto de 31-norcicloartanona, o espectro de infravermelho da cicloeucalenona (**24**) apresenta, uma banda a 1711 cm^{-1} (C=O) que é originada pelo grupo carbonilo em C-3 quando os anéis A e B são

saturados.¹³⁵ A presença deste grupo foi também confirmada pelo sinal, no espectro de RMN de carbono, a δ 213,3 ppm o qual apresenta uma correlação a longa distância com o sinal do metilo em C-30 a δ 0,98 ppm (3H, *d*, $J_{30,4}$ =6,7 Hz) e com o multiplete do metileno em C-2 a δ 2,42 ppm (*m*) (Tabela I.2.2).

A presença de um anel de ciclopropano foi indicada pela banda no espectro no IV a 3020 cm^{-1} atribuível ao metileno em C-19 do anel de ciclopropano e pelos dois sinais dos dois prótons não equivalentes a campo alto δ 0,39 ppm (1H, *d*, $J_{19\text{exo},19\text{endo}}$ =4,0 Hz) e a 0,62 ppm (1H, *d*, $J_{19\text{endo},19\text{exo}}$ =3,6 Hz) os quais, à semelhança do que está descrito para a cicloeucalenona, indicam a presença de apenas um grupo metilo em C-4.¹²³ Estes sinais encontram-se correlacionados por HMQC com o sinal do carbono metilénico C-19 (DEPT) a δ 27,2 ppm. Observa-se no espectro de COSY-H,H que, para além do sinal do próton H-19*endo* se encontrar acoplado com o próton H-19*exo*, apresenta também uma correlação a longa distância com o sinal de H-1 α , tal como foi descrito para o cicloeucalenol.¹²⁷ Também se observam correlações no espectro de HMBC entre os prótons do metileno em C-19 e os sinais referentes aos átomos de carbono C-11 (δ 25,9 ppm) e C-1 (δ 32,8 ppm), respectivamente.

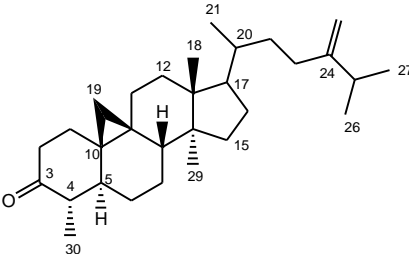
Existem, no espectro de ^1H RMN, dois sinais que se referem a dois grupos metilo terciários a δ 0,91 ppm e a δ 1,00 ppm que correspondem por HMQC aos sinais dos carbonos a δ 19,2 ppm (C-29) e a δ 17,9 ppm (C-18). Observam-se também quatro sinais de quatro grupos metilo secundários a δ 0,90 ppm (3H, *d*, $J_{21,20}$ = 4,8 Hz), δ 0,98 ppm (3H, *d*, $J_{30,4}$ = 6,7 Hz), δ 1,02 ppm (3H, *d*, $J_{26,25}$ = 6,8 Hz) e δ 1,03 ppm (3H, *d*, $J_{27,25}$ = 6,8 Hz) que estão correlacionados por HMQC aos sinais dos carbonos dos grupos metilo a δ 18,3 ppm (C-21), δ 10,7 ppm (C-30), δ 21,9 ppm (C-26) e δ 22,0 ppm (C-27), respectivamente.

Os sinais permutáveis dos grupos metilo em C-26 e C-27 a δ 1,02 ppm e a δ 1,03 ppm apresentam, na experiência de COSY-H,H um sinal de acoplamento com o próton H-25 a δ 2,22 ppm (1H, *h*, $J_{25,26/27}$ =6,3 Hz), o qual corresponde por HMQC com o sinal do carbono a δ 33,8 ppm. Esta atribuição do sinal de H-25 foi confirmada pela correlação por HMBC observada entre este sinal e os sinais dos carbonos C-26 e C-27 a δ 21,9 e 22,0 ppm, respectivamente (Tabela I.2.2).

Para além dos seis grupos metilo, a experiência DEPT revelou a presença de onze grupos metileno, seis grupos metino e seis carbonos quaternários.

Discussão de Resultados

Tabela I.2.2. Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a (+)-cicloeucalenona (**24**) (CDCl_3), correlações COSY ^1H - ^1H e HMBC.

				
C	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz))	COSY (^1H - ^1H)	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	32,8	α 1,66 (m)	H-19 β , H-2	----
2	41,0	----	----	C ₁ , C ₃ , C ₁₀
3	213,3	β 2,42 (m)	H-1 α	----
4	50,0	----	----	----
5	46,0	2,23 (m)	H-30	C ₃ , C ₃₀
6	25,2	α 1,57 (m)	H-6 β	----
7	28,1	β 0,73 (qd, $J_{6\beta,6\alpha}=11,2$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=3,0$ Hz)	H-6 α , H-7 α	----
8	47,1	α 1,17 (m)	H-6 β	----
9	24,9	β 1,39 (m)	----	----
10	29,3	----	----	----
11	25,9	----	----	----
12	35,4	----	----	----
13	45,4	----	----	----
14	48,8	----	----	----
15	32,8	----	----	----
16	27,0	1,89 (m)	H-17	C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₇
17	52,2	1,54 (m)	H-20	C ₁₈
18	17,9	1,00 (s)	----	----
19	27,2	exo 0,39 (d, $J_{19\alpha,19\beta}=4,0$ Hz)	H-19endo	----
20	36,1	endo 0,62 (d, $J_{19\beta,19\alpha}=3,6$ Hz)	H-19exo, H1 α	C ₁ , C ₁₁
21	18,3	1,40 (m)	H-21, H-17	----
22	35,0	0,90 (d, $J_{21,20}=4,8$ Hz)	H-20	C ₁₇ , C ₂₀ , C ₂₂
23	31,3	1,17 (m)	H-21	----
24	156,8	1,65 (m)	H-21	----
25	33,8	1,89 (m)	H-28	----
26	21,9*	2,08 (m)	----	----
27	22,0*	----	----	----
28	106,0	2,22 (h, $J_{25,26/27}=6,3$ Hz)	H-26, H-27	C ₂₄ , C ₂₆ , C ₂₇ , C ₂₈
29	19,2	1,02 (d, $J_{26,25}=6,8$ Hz)*	H-25	C ₂₄ , C ₂₅ , C ₂₇
30	10,7	1,03 (d, $J_{27,25}=6,8$ Hz)*	H-25	C ₂₄ , C ₂₅ , C ₂₆
		A 4,72 (sl)	H-23	C ₂₃ , C ₂₄ , C ₂₅
		B 4,66 (sl)	----	----
		0,91 (s)	----	----
		0,98 (d, $J_{30,4}=6,7$ Hz)	H-4	C ₃

*-sinais permutáveis

Tal como foi descrito para o cicloeucalenol,¹²⁷ o sinal do próton H-6 β surge a campo alto a 0,73 ppm (1H, qd, $J_{6\beta,6\alpha}=11,2$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=3,0$ Hz) e está correlacionado por COSY-H,H com os prótons H-6 α a δ 1,57 ppm (m) e H-7 α a δ 1,17 ppm (m).

No espectro de ^1H RMN observam-se dois sinais de prótons a δ 4,66 ppm (1H, *s*) e a δ 4,72 ppm (1H, *s*) que sugerem a presença de um grupo exometileno terminal da cadeia lateral o que foi confirmado pela presença no espectro no infravermelho de duas bandas a 1642 ($\nu_{\text{C}=\text{CH}_2}$) e a 886 ($\delta_{\text{C}=\text{CH}_2}$) cm^{-1} .¹²⁵ Os sinais referentes aos dois prótons em C-28 a δ 4,66 ppm e a δ 4,72 ppm estão correlacionados por HMQC com o sinal do carbono a δ 106,0 ppm. A posição da ligação dupla em C-24 foi confirmada pela existência de dois sinais de acoplamento a três ligações com os prótons H-23 α e β a δ 1,89 (*m*) e a 2,08 (*m*) na experiência de COSY-H,H, à semelhança do que foi descrito para o cicloeucalenol.¹²⁷ Observam-se também correlações por HMBC dos prótons em C-28 com o sinal a δ 156,8 ppm do carbono quaternário C-24, com o sinal de C-23 a δ 31,3 ppm e com o sinal de C-25 a δ 33,8 ppm o qual está por sua vez correlacionado com os sinais dos prótons dos metilos em C-26 e C-27, como foi referido anteriormente (Figura I.2.5).

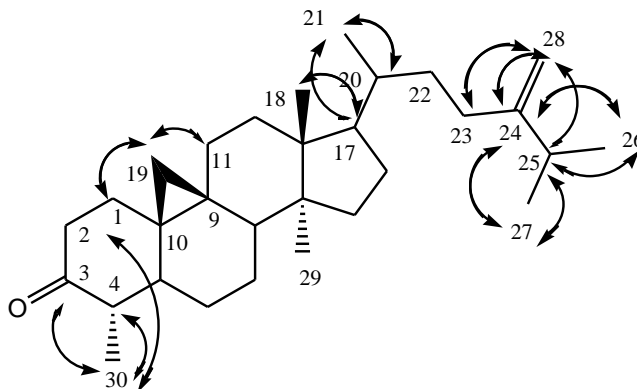
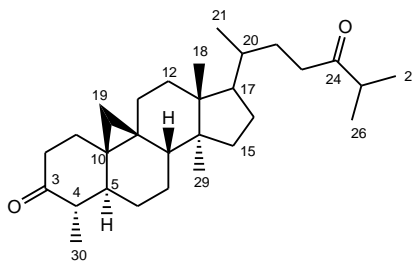


Figura I.2.5 Correlações de HMBC observadas para a (+)-cicloeucalenona (**24**).

O sinal do metilo em C-30, sob a forma de duplete a δ 0,98 ppm com uma constante de acoplamento $J_{30,4}=6,7$ Hz, sugere a presença do epímero C-4 α ,¹³⁶ o que foi confirmado pelo valor da rotação óptica específica, a qual foi indispensável na determinação da estereoquímica de **24** nomeadamente na orientação do grupo metilo em C-4. Assim, o valor obtido ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +54,9^\circ$ (c 0.67, CHCl_3) está de acordo com o descrito na literatura ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +54,4^\circ$ (c 0.89, CHCl_3)¹²³ para a estrutura **24**.

(+)-24-oxo-31-norcicloartanona



107

Da fração **B54** foi isolada a 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**), um outro triterpeno com o esqueleto de 31-norcicloartanona anteriormente isolado de *Musa sapientum* L.¹³⁷

À semelhança do composto **24**, a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) foi revelada em placa de TLC de sílica gel após pulverização com solução de ácido molibdofosfórico o que sugere a presença de unidades carbonadas saturadas na molécula.

O espectro de massa de **107** apresenta um sinal correspondente ao ião molecular $[M]^+$ a m/z 426 u.m.a. e um padrão de fragmentação análogo ao descrito para a 24-oxo-28-norcicloartanona¹³⁷ apresentando iões fragmento a m/z 411 $[M-CH_3]^+$, m/z 340 $[(M-C_5H_{10}O \text{ (rearranjo de McLafferty)}]^+$,^{131,132} m/z 299 $[M-C_8H_{15}O \text{ (cadeia lateral)}]^+$, m/z 257 $[M-C_8H_{15}O \text{ (cadeia lateral)} - C_3H_6 \text{ (carbonos C-15, C-16 e C-17 do anel D)}]^+$ ¹³³ e m/z 243 $[M^+ \text{-cadeia lateral } -C_3H_6-CH_2]^+$.^{137,134}

As atribuições dos sinais dos espectros de 1H RMN e ^{13}C RMN foram feitas com base em experiências de DEPT, HMQC e HMBC.

Tal como se apresenta na Tabela I.2.3 e à semelhança da cicloeucalenona (**24**), os espectros da 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) apresentam os sinais característicos da presença do grupo carbonilo em C-3 quando os anéis A e B são saturados: a banda no espectro no IV a 1711 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$), o sinal no espectro de carbono a δ 213,3 ppm com uma correlação a longa distância com o sinal do metilo em C-30 o qual surge no espectro de próton a δ 0,98 ppm (3H, d , $J_{30,4}=6,4 \text{ Hz}$).

Observam-se também os dois sinais dos prótons não equivalentes do anel de ciclopropano a campo alto δ 0,39 (1H, d , $J_{19\text{exo},19\text{endo}}=4,0 \text{ Hz}$) e a 0,61 (1H, d , $J_{19\text{endo},19\text{exo}}=3,8 \text{ Hz}$) correlacionados por HMQC com o sinal do metileno (DEPT) a δ 27,1 ppm. A presença de dois grupos metilo terciários CH_3 -

18 e CH₃-29 foi indicada pelos singuletos a δ 0,90 ppm e a δ 0,99 ppm que correspondem por HMQC aos sinais a δ 19,1 ppm (C-29) e a δ 17,9 ppm (C-18).

O espectro de ¹H RMN da 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) difere do espectro do espectro de ¹H RMN da cicloeucalenona (**24**) pelo desaparecimento dos dois sinais correspondentes aos dois prótons do grupo exometileno. Por outro lado, a presença de um grupo carbonilo adicional na cadeia lateral do composto **2** foi evidenciada pela presença, no espectro de ¹³C RMN, de um sinal a δ 215,4 ppm referente ao carbono C-24, o qual apresentava correlações por HMBC com o sinal do metino H-25 que, devido ao efeito anisotrópico do carbonilo em C-24, surgiu desviado para campo baixo surgindo a δ 2,61 ppm.

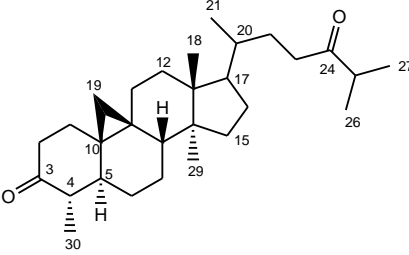
O sinal em C-24 encontra-se também correlacionado a longa distância com o duplete referente à sobreposição dos sinais dos prótons dos grupos metilo em C-26 e C-27 que surge a um valor de desvio químico inferior a δ 1,09 ppm (6H, *d*, *J*=6,9 Hz). Os sinais dos prótons não equivalentes do grupo metileno em C-23, que se encontram também acoplados a longa distância com o carbonilo em C-24, surgem igualmente desviados para campo mais baixo a δ 2,49 ppm e δ 2,38 ppm (Tabela I.2.3).

A presença do grupo carbonilo em C-24 provocou assim alterações nos sinais dos átomos de carbono α relativamente a C-24 (C-23 e C-25) que apresentam valores de desvio químico mais elevados enquanto que os β (C-22 e C-26) foram desviados para campo mais alto (Tabela I.2.3).¹³⁸

Tal como se observou no espectro da cicloeucalenona (**24**), o sinal do metilo em C-30 surge sob a forma de duplete a δ 0,98 ppm com uma constante de acoplamento $J_{30,4}$ =6,4 Hz o que está de acordo com a orientação deste grupo metilo C-4 α ,¹³⁶ o que foi confirmado pelo valor da rotação óptica específica observada ($[\alpha]_D^{20}$ +53,2° (*c* 0.46, CHCl₃), a qual foi indispensável na determinação da estereoquímica de **111** nomeadamente na orientação do grupo metilo em C-4.

Discussão de Resultados

Tabela I.2.3 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a 4 α -(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) (CDCl_3) e correlações HMBC.

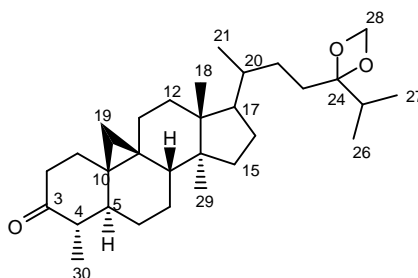
			
C	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz))	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	32,8	1,66 (m)	----
2	40,9	----	C ₁ , C ₃ , C ₁₀
3	213,3	β 2,41 (m)	----
4	50,0	2,22 (m)	C ₃ , C ₅ , C ₃₀
5	46,0	----	----
6	25,2	----	----
7	28,0	β 0,72 (qd, $J_{6\beta,6\alpha}=12,0$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=2,4$ Hz)	----
8	47,0	1,26 (m)	----
9	24,9	----	----
10	24,9	----	----
11	25,9	----	----
12	35,4	----	----
13	45,4	----	----
14	48,8	----	----
15	32,8	1,62 (m)	----
16	26,9	1,66 (m)	C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₇
17	52,2	1,57 (m)	----
18	17,9	0,99 (s)	C ₁₇
19	27,1	exo 0,39 (d, $J_{19\text{exo},19\text{endo}}=4,0$ Hz)	C ₁ , C ₈ , C ₁₁
20	35,7	endo 0,61 (d, $J_{19\text{endo},19\text{exo}}=3,8$ Hz)	----
21	18,4	1,37 (m)	C ₂₁
22	30,1	0,87 (d, $J=6,4$ Hz)	C ₁₇ , C ₂₀ , C ₂₂
23	37,5	1,20 (m)	C ₂₁
24	215,4	1,70 (m)	----
25	40,8	A 2,49 (m)	C ₂₄
26	18,3*	B 2,38 (m)	----
27	18,1*	----	----
29	19,1	2,61 (h, $J_{25,26/27}=6,9$ Hz)	C ₂₄ , C ₂₆ , C ₂₇
30	10,7	1,09 (d, $J_{26,25}=6,9$ Hz)	C ₂₄ , C ₂₅
		1,09 (d, $J_{27,25}=6,9$ Hz)	C ₂₄ , C ₂₅
		0,90 (s)	C ₁₃
		0,98 (d, $J_{30,4}=6,4$ Hz)	C ₃ , C ₄ , C ₅

* sinais permutáveis

A estrutura do triterpeno foi confirmada pelas correlações a longa distância observadas entre os prótons do metilo em C-30 e o sinal do carbonilo em C-3, o qual está por sua vez correlacionado com o sinal de C-2. Também se observam correlações no espectro de HMBC entre os prótons do metileno C-19 e os sinais referentes aos átomos de carbono C-11 (δ 25,9 ppm) e C-1 (δ 32,8 ppm),

respectivamente. A estrutura da cadeia lateral foi esclarecida por correlações de HMBC observadas entre o metilo em C-21 e os sinais dos átomos de carbono C-20 (δ 35,7 ppm) e C-22 (δ 30,1 ppm).

(+)-24-(1,3-dioxetan-2-il)-31-norcicloartanona [(2*aR*,3*R*,5*aS*,8*S*,11*aR*,12*aS*)-3((*R*)-4-(2-isopropil-1,3-dioxietan-2-il)-2*a*,5*a*,8-trimetiltetradeca-hidroiclopenta[*a*]ciclopropa[*e*]fenantren-9(1*H*)-ona]



108

O terceiro produto isolado da fração **B33** foi a (+)-24-(1,3-dioxetan-2-il)-31-norcicloartanona (**112**), a qual possui um grupo cetal invulgar na cadeia lateral.

O espectro de massa do composto **108** apresenta um sinal a m/z 426 u.m.a. que se verificou não corresponder ao ião molecular da estrutura. Este sinal corresponde à perda de um fragmento $-\text{OCH}_2$ da unidade cetal da cadeia lateral (Figura I.2.6). O espectro possui um padrão de fragmentação análogo ao descrito para a 24-oxo-28-norcicloartanona¹³⁷ apresentando iões fragmento a m/z 340 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$ (parte da cadeia lateral)], m/z 299 [$\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{17}$ (cadeia lateral)] e m/z 243 [M^+ -cadeia lateral - anel D - CH_2]].

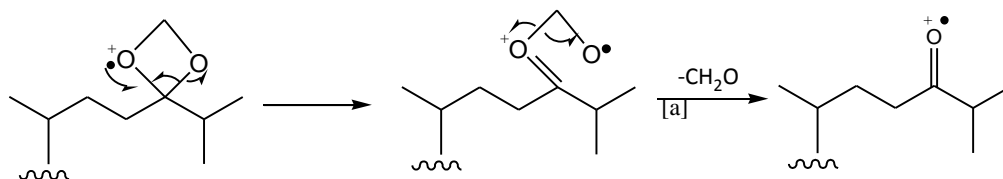


Figura I.2.6 Mecanismo da ruptura do cetal.

As atribuições dos sinais dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN foram feitas com base em experiências de DEPT, HMQC, HSQC e HMBC e encontram-se resumidas na Tabela I.2.4.

Os espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN do composto **108** distingue-se dos espectros dos compostos **24** e **107** pela presença, no espectro de ^1H RMN, de dois sinais a campo baixo a δ 5,08 ppm (1H, *d*, $J=2,7$ Hz) e a δ 5,10 ppm (1H, *s*) que se encontram correlacionados por HMQC com um sinal a δ 94,4 ppm que corresponde ao átomo de carbono secundário C-28 (DEPT) de um cetol. A presença deste grupo foi confirmada pela presença, no espectro de IV, de uma banda a 1055 cm^{-1} originada pela deformação axial assimétrica da ligação C-O-C característica deste grupo. A localização do cetol adicional na cadeia lateral foi confirmada pela existência de correlações de HMBC entre o grupo metileno em C-28 e o sinal do carbono quaternário C-24 a δ 113,4 ppm. Observam-se também correlações entre C-24 e os sinais dos prótons H-23 a δ 1,66 e 1,27 ppm, o sinal do metino H-25 a δ 2,05 ppm e os sinais dos grupos metilo em C-26 e C-27 (Tabela I.2.4).

Tal como foi descrito para os compostos **24** e **107**, os espectros do composto **108** apresentam os sinais característicos do grupo carbonilo em C-3 (a δ 213,4 ppm no espectro de ^{13}C correlacionado por HMBC com o metilo em C-30), do anel de ciclopropano (a δ 0,40 ppm (1H, *d*, $J_{19\text{exo},19\text{endo}}=4,0$ Hz) e a δ 0,62 ppm (1H, *d*, $J_{19\text{endo},19\text{exo}}=3,6$ Hz) no espectro de próton e a δ 27,0 ppm no espectro de carbono). Observam-se também os sinais referentes a dois grupos metilo terciários CH_3 -29 e CH_3 -18 (a δ 0,90 ppm e a 1,00 ppm no espectro de ^1H RMN e a δ 19,2 ppm e a δ 17,3 ppm no espectro de ^{13}C RMN).

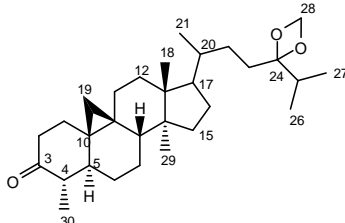
A existência de quatro grupos metilo secundários CH_3 -21, CH_3 -30, CH_3 -26 e CH_3 -27 foi também sugerida pelos sinais no espectro de próton a δ 0,88 ppm (3H, *d*, $J_{21,20}=6,6$ Hz), δ 0,97 ppm (3H, *d*, $J_{30,4}=5,7$ Hz), 0,99* (3H, *d*, $J_{26,25}=6,7$ Hz) e 0,98* (3H, *d*, $J_{27,25}=6,7$ Hz) os quais estão correlacionados por HMQC com os sinais dos carbonos a δ 18,2 ppm, δ 10,8 ppm, δ 16,9* ppm e δ 17,5* ppm, respectivamente, sendo os dois últimos permutáveis.

Também os sinais, do espectro de ^{13}C RMN, característicos do núcleo triterpénico eram idênticos aos observados para a cicloeucalenona (**24**) e para 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e estão de acordo com uma estrutura 31-norcicloartanona.

Tal como se observou no espectro dos compostos **24** e **107**, o sinal do metilo C-30 surge sob a forma de duplete a δ 0,97 ppm com uma constante de acoplamento $J_{30,4}=5,7$ Hz sugerindo a presença do epímero C-4 α ,¹³⁶ o que foi confirmado pelo valor da rotação óptica específica observada ($[\alpha]_D^{20} +36,8^\circ$ (c 0.26, CHCl_3), a qual foi indispensável na determinação da estereoquímica de **112** nomeadamente na orientação do grupo metilo em C-4.

Discussão de Resultados

Tabela I.2.4 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a (+)-(-)24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (**108**) (CDCl_3) e correlações HMBC.

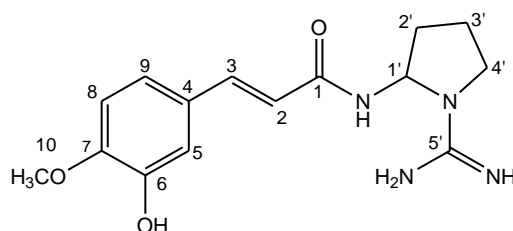
			
C	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz))	HMBC /HSQC (^1H - ^{13}C)
1	32,8	A 1,87(m) B 1,64 (m)	C ₂ , C ₃
2	41,0	A 2,42 (m) B 1,85 (m)	C ₁ , C ₃ , C ₁₀
3	213,4	----	----
4	50,0	2,23 (m)	C ₃ , C ₅ , C ₃₀
5	46,0	1,58 (m)	C ₄ , C ₆ , C ₃₀
6	25,8	β 0,73 (m; $J_{6\beta,6\alpha}=12,5$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=2,3$ Hz) α 1,70 (m)	C ₄ , C ₈ , C ₁₅ , C ₃₀
7	25,2	A 1,37 (m) B 1,12 (m)	C ₄ , C ₈
8	47,1	1,65 (m)	C ₁₄ , C ₁₅
9	24,9	----	----
10	29,3	----	----
11	29,6	A 1,80 (m) B 1,25 (m)	C ₉
12	32,9	1,59 (m)	----
13	45,4	----	----
14	48,8	----	----
15	35,4	1,32 (m)	----
16	28,1	A 1,94 (m) B 1,33 (m)	C ₁₅ , C ₁₇ , C ₂₁
17	52,1	1,60 (m)	C ₁₅ , C ₂₁
18	17,3	1,00 (s)	C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₇
19	27,0	exo 0,40 (d, $J_{19\text{exo},19\text{endo}}=4,0$ Hz) endo 0,62 (d, $J_{19\text{endo},19\text{exo}}=3,6$ Hz)	C ₁ , C ₅ , C ₁₀ , C ₁₁
20	36,1	1,40 (m)	C ₂₁
21	18,2	0,88 (d, $J_{21,20}=6,6$ Hz)	C ₁₅ , C ₁₇ , C ₂₀ , C ₂₂
22	29,1	A 1,56 (m) B 1,12 (m)	C ₂₀ , C ₂₁
23	27,2	A 1,66 (m) B 1,27 (m)	C ₂₂
24	113,4	----	----
25	33,2	2,05 (m)	C ₂₄ , C ₂₇
26	16,9*	0,99* (d, $J_{26,25}=6,7$ Hz)	C ₂₄ , C ₂₅ , C ₂₇
27	17,5*	0,98* (d, $J_{27,25}=6,7$ Hz)	C ₂₄ , C ₂₅ , C ₂₆
28	94,4	A 5,10 (s) B 5,08 (d, $J=2,6$ Hz)	C ₂₄
29	19,2	0,90 (s)	C ₈ , C ₁₅
30	10,8	0,97 (d, $J_{30,4}=5,7$ Hz)	C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅

* sinais permutáveis.

I.2.5.2 Elucidação estrutural das amidas dos ácidos hidroxicinâmicos

A partir da fracção **D** do extracto etanólico foram isolados, pela primeira vez, quatro novos alcalóides cujos nomes triviais são cernumidina (**109**), isocernumidina (**110**), cernumidina B (**111**) e isocernumidina B (**112**) os quais resultam da condensação na forma de amida da unidade (2-aminopirrolidin-1-il)carboxamidina com os ácidos isoferúlicos *E* e *Z* [ácido *E/Z*-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)propenóico].

Cernumidina [(*E*)-*N*-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilamida]



109

A análise da estrutura da cernumidina **109** isolada da fracção **D4**, com base em estudos comparativos com os dados espectroscópicos descritos para as amidas dos ácidos hidroxicinâmicos^{139,70} revelou a presença de uma amida derivada do ácido ferúlico e de uma função guanidina. As atribuições dos sinais dos espectros de ¹H RMN e de ¹³C RMN basearam-se nas experiências de COSY-H,H, DEPT, HMQC e HMBC e encontram-se resumidas na Tabela I.2. 5.

No espectro de massa de alta resolução observa-se a presença de um sinal a *m/z* 305,1607 u.m.a. que corresponde ao ião molecular [M+H]⁺ o qual está de acordo com a fórmula molecular C₁₅H₂₀N₄O₃ (calc. C₁₅H₂₁N₄O₃ 305,1569).

O espectro de ¹H RMN apresenta, à semelhança de outros derivados do ácido cinâmico 3,4-dissubstituídos,^{68,140} sinais atribuíveis aos protões H-2 e H-3 de uma olefina dissubstituída do fragmento propenóide a δ 6,45 ppm (1H, *d*, *J*_{2,3}=15,6 Hz) e a δ 7,52 ppm (1H, *d*, *J*_{3,2}=15,6 Hz), respectivamente. O valor da constante de acoplamento de 15,6 Hz corresponde à posição relativa *trans* entre os protões H-2 e H-3. Os sinais dos protões H-2 e H-3 encontram-se correlacionados por HMQC com os sinais a δ 117,6 ppm e δ 144,4 ppm, respectivamente (Figura I.2.7).

Observam-se também os sinais atribuíveis a um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído a δ 7,05 ppm (1H, *sl*, H-5), a δ 7,01 ppm (1H, *dd*, $J_{9,8}=9,0$ Hz, $J_{9,5}=1,2$ Hz, H-9) e a δ 6,92 ppm (1H, *d*, $J_{8,9}=8,4$ Hz, H-8) correspondentes aos três prótons aromáticos do sistema ABX. Estes sinais estão correlacionados por HMQC com os sinais dos átomos de carbono a δ 112,5 ppm, a δ 114,6 ppm e a δ 122,7 ppm referentes aos átomos de carbono C-8, C-5 e C-9 do anel, respectivamente.

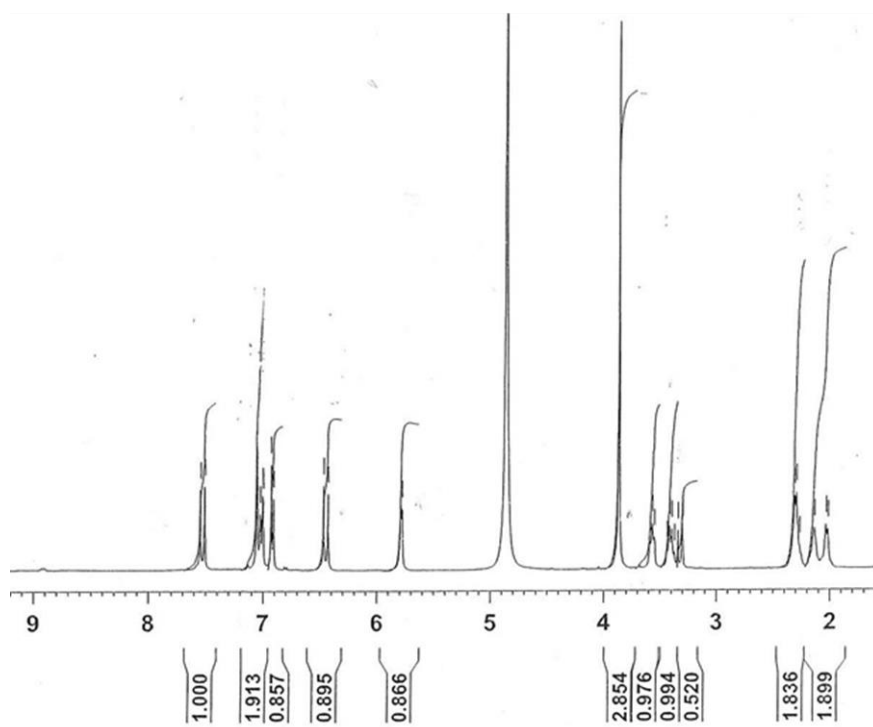


Figura I.2.7 Espectro de ^1H RMN da cernumidina (**109**) em CD_3OD .

Surge também, no espectro de ^1H RMN, um sinal que surge na forma de singuleto largo a δ 3,86 ppm (3H, *s*) ao qual corresponde por HMQC o sinal a δ 56,4 ppm, correspondente ao átomo de carbono do grupo metoxilo em C-7. O sinal a δ 3,86 ppm está correlacionado por HMBC com o sinal de C-7 a δ 151,3 ppm, o qual está por sua vez correlacionado com os prótons H-5 a δ 7,05 ppm e H-9 a δ 7,01 ppm. Estas correlações vêm confirmar a posição do grupo metoxilo em C-7.

A presença de um grupo amida na molécula foi evidenciada pelas duas bandas de absorção, no espectro de infravermelho, a 1653 cm^{-1} devida às vibrações de alongamento do grupo carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ e a 3358 cm^{-1} atribuível às vibrações de alongamento (NH) e pela presença, no espectro de ^{13}C RMN, de um sinal a 170,0 ppm referente ao átomo de carbono do carbonilo em C-1. Este sinal está correlacionado por HMBC com os sinais dos prótons da ligação dupla H-2 e H-3.

A presença da amida foi confirmada pelo aparecimento de um duplete, no espectro de ^1H RMN em dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$), a δ 9,05 ppm (d, $J_{\text{NH},10}=8,2$ Hz) o qual está correlacionado por HMQC com o carbonilo em C-1.

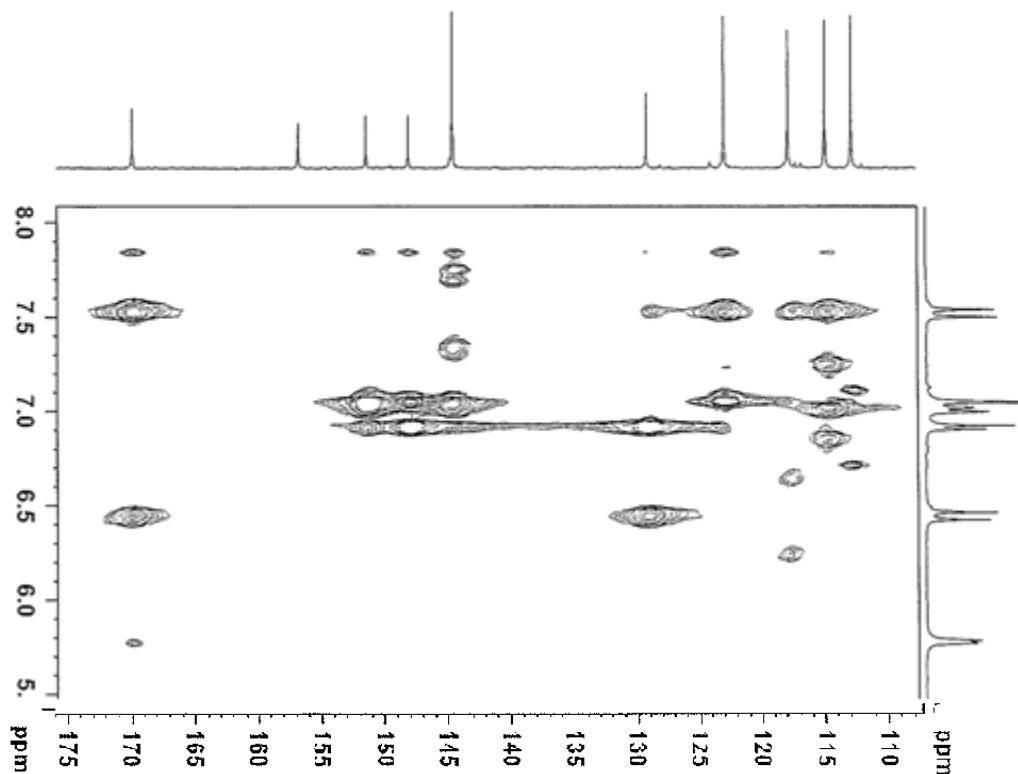


Figura I.2.8 Excerto do espectro de HMBC da cernumidina (**109**) em CD_3OD .

A estrutura do fragmento *trans*-isoferuílio foi esclarecida pelas correlações a longa distância observadas entre o próton H-3 e os sinais dos átomos do anel C-4, C-5 e C-9. Também se observa um sinal entre o próton H-3 olefínico e o sinal do carbonilo em C-1. Por outro lado, a proximidade entre os prótons olefínicos, o anel aromático e a amida foi confirmada pelas correlações de HMBC observadas entre o próton H-2 e os sinais dos carbonos C-4 e C-1 a δ 129,0 e a 170,0 ppm, respectivamente (Figura I.2.8).

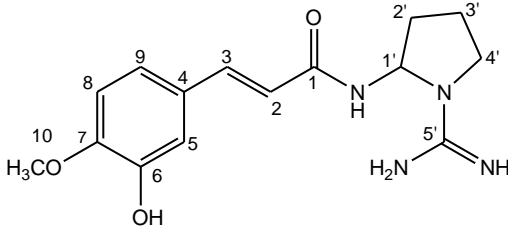
O espectro de ^{13}C RMN do composto **109** apresenta quinze sinais. A experiência de DEPT permitiu a diferenciação dos sinais de ^{13}C RMN revelando a presença de um grupo metilo, três grupos metileno, seis grupos metino e cinco carbonos quaternários. Verificou-se a presença dos sinais característicos do fragmento *trans*-feruílio e os sinais dos restantes três grupos metileno, de um grupo

Discussão de Resultados

metino e de um carbono quaternário foram atribuídos através de experiências bidimensionais 2D RMN e de desacoplamento.

A presença de um grupo guanidina na molécula foi sugerida pela presença, no espectro de ^{13}C RMN, de um sinal referente a um átomo de carbono quaternário a δ 156,7 ppm e foi confirmada pela coloração positiva observada após revelação com o reagente de Sakaguchi.^{141,142} Verificou-se também que na integração total do espectro em DMSO- d_6 estão incluídos mais três prótons que não foram atribuídos anteriormente e que correspondem aos três prótons do grupo guanidínico.

Tabela I.2.5 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a cernumidina (**109**) (CD_3OD e DMSO- d_6), correlações COSY ^1H - ^1H e HMBC.

						
C	δ_{C} (CD_3OD)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (CD_3OD)	δ_{C} (DMSO)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz))	COSY (^1H - ^1H)	HMBC (CD_3OD) (^1H - ^{13}C)
1	170,0	----	167,2	----	----	----
2	117,6	6,45 (d, $J_{2,3}$ =15,6 Hz)	117,2	6,42 (d, $J_{2,3}$ =15,7 Hz)	----	C ₁ , C ₄
3	144,4	7,52 (d, $J_{3,2}$ =15,6 Hz)	141,8	7,42 (d, $J_{3,2}$ =15,6 Hz)	----	C ₁ , C ₄ , C ₅ , C ₉
4	129,0	----	127,1	----	----	----
5	114,6	7,05 (sl)	113,5	6,99 (sl)	----	C ₆ , C ₉
6	148,0	----	146,8	----	----	----
7	151,3	----	149,8	----	H ₃	----
8	112,5	6,92 (d, $J_{8,9}$ =8,3 Hz)	112,1	6,95 (d, $J_{8,9}$ =8,0 Hz)	H ₂	C ₄ , C ₆ , C ₇
9	122,7	7,01 (d, $J_{9,8}$ =8,3 Hz, $J_{9,5}$ =1,2 Hz)	120,9	7,00 (d, $J_{9,8}$ =8,1 Hz)	----	C ₃ , C ₅ , C ₇
OCH ₃	56,4	3,86 (sl)	55,6	3,79 (sl)	----	C ₇
NH	----	----	----	9,05 (d, J= 8,2 Hz)	----	----
ArOH	----	----	----	9,27 (sl)	----	----
1'	65,4	5,78 (d, $J_{1',2'}$ =5,2 Hz)	63,6	5,65 (sl)	-NH, CH-2'	C ₁ , C _{2'} , C _{3'} , C _{4'}
2'	33,4	A 2,30 (m) B 2,03 (m)	32,0	A 2,18 (m) B 1,90 (m)	H _{1'}	C _{3'}
3'	23,7	A 2,30 (m) B 2,14 (m)	22,4	A 2,18 (m) B 2,04 (m)	H _{4'}	C _{4'}
4'	48,1	A 3,57 (m) B 3,40 (m)	47,0	A 3,44 (m) B 3,31 (m)	H _{3'}	C _{2'} , C _{3'}
5'	156,7	----	154,6	----	----	----

A proximidade entre o próton H-1' a δ 5,65 ppm (sl), e o átomo de azoto da amida a δ 9,05 ppm (d, $J_{\text{NH},1'}=8,2$ Hz) foi evidenciada pelo acoplamento no espectro de COSY-H,H traçado em DMSO- d_6 e pela correlação a longa distância observada entre este sinal e o do átomo do carbonilo em C-1. O sinal de H-1' corresponde por HMQC ao sinal do metino (DEPT) a δ 65,4 ppm, o único da estrutura, e com desvio químico característico dada a proximidade a átomos de azoto. Observam-se também

correlações por HMBC entre o sinal de H-1' e os átomos de carbono dos grupos metilenos C-2', C-3' e C-4' a δ 33,4 ppm, a δ 23,7 ppm e a δ 48,1 ppm, respectivamente. Os prótons do metileno CH₂-4' a δ 3,57 ppm (*m*) e δ 3,40 ppm (*m*) apresentam também correlações a longa distância com os carbonos dos metilenos C-2' e C-3'.

A presença de um grupo pirrolidínico ligado ao átomo de azoto da amida foi confirmada pelos acoplamentos observados, no espectro de COSY-H,H traçado em DMSO-*d*₆, entre o próton do metino CH-1' e os prótons do grupo metileno CH₂-2' a δ 2,18 ppm (*m*) e δ 1,90 ppm (*m*), os quais estão correlacionados com os prótons do grupo metileno CH₂-3' a δ 2,18 ppm (*m*) e δ 2,04 ppm (*m*). Por último observa-se correlações entre estes e os prótons do grupo metileno CH₂-4' a δ 3,44 ppm (*m*) e δ 3,31 ppm (*m*).

Com o objectivo de confirmar a subestrutura de *N*-(2-pirrolidinil)isoferulamida proposta foram realizadas experiências de desacoplamento no espectro de ¹H RMN em DMSO-*d*₆. A irradiação do sinal do próton H-1' a δ 5,65 ppm (1H, *s*/) modificou apenas o sinal a δ 2,18 (*m*) relativo aos prótons H-2'A e H-3'A. A irradiação do sinal a δ 2,18 (*m*) simplificou os sinais de todos os outros prótons do anel. A alteração mais notória ocorreu no sinal do duplete H-1' o qual se tornou singuleto devido à ausência de acoplamento entre os prótons respectivos. A irradiação dos sinais dos prótons H-4'A e H-4'B a δ 3,44 ppm (*m*) e δ 3,31 ppm (*m*) simplificou o sinal a δ 2,18 (*m*) relativo aos prótons H-2'A e H-3'A. A irradiação de δ 2,04 (*m*) e δ 1,90 (*m*) relativos aos prótons H-3'B e H-2'B simplificaram o multiplete a δ 2,18 (*m*) relativo aos prótons H-2'A e H-3'A (Figura I.2.9).

Foram também realizadas experiências de desacoplamento para provar o acoplamento entre o metino H-1' e o próton da amida, nos espectros de ¹H RMN em DMSO-*d*₆. O desacoplamento do sinal a δ 9,05 ppm simplificou o sinal do próton H-1' a δ 5,65 ppm (1H, *s*/) e a irradiação do sinal do próton H-1' a δ 5,65 ppm (1H, *s*/) permitiu que o duplete relativo ao grupo NH a δ 9,05 (*d*, *J*=8,2 Hz) da amida simplificasse a singuleto o que mostra que o duplete era devido ao acoplamento entre o NH da amida e o próton H-1'. Por outro lado, a irradiação do sinal a δ 9,27 ppm (*sl*) não provocou qualquer alteração no espectro, o que indica que este sinal corresponde ao grupo hidroxilo fenólico do fragmento isoferuloílo (Figura I.2.9).

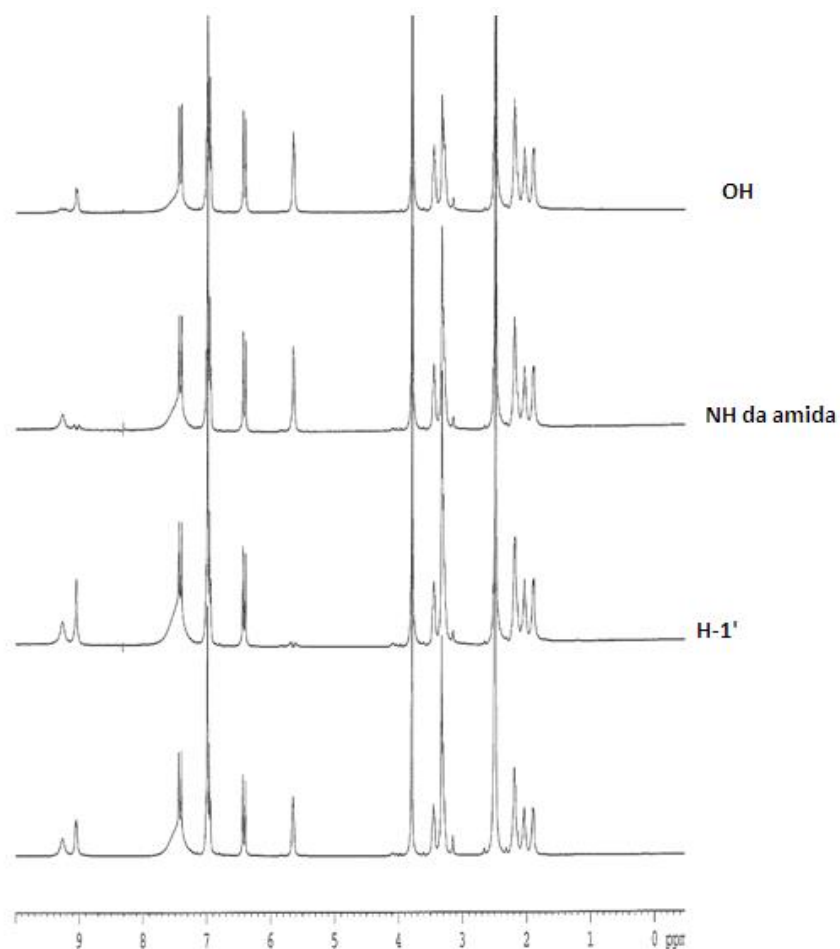
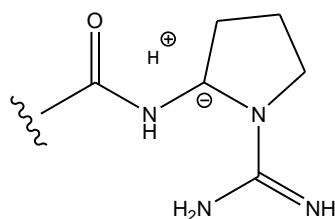


Figura I.2.9 Experiências de desacoplamento realizadas no espectro de de ^1H RMN da cernumidina (**109**) em $\text{DMSO}-d_6$.

Estes dados conduziram à atribuição da estrutura **109** para a cernumidina como (*E*)-*N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-isoferulamida. Para confirmação da estrutura, uma amostra do composto foi cristalizada sucessivamente em metanol p.a. até obtenção de cristais para análise por difracção de Raios X. A estrutura proposta foi confirmada tal como representado na Figura I.2.10.



Para demonstrar a reatividade do grupo amina, foi adicionada ao tubo de RMN uma quantidade diminuta de ácido clorídrico deuterado DCl. Na presença deste, dá-se a protonação com o deutério no azoto da guanidina, com a abertura do anel formando o íon acilimínio. Este processo favorece a racemização sobre C-1'.

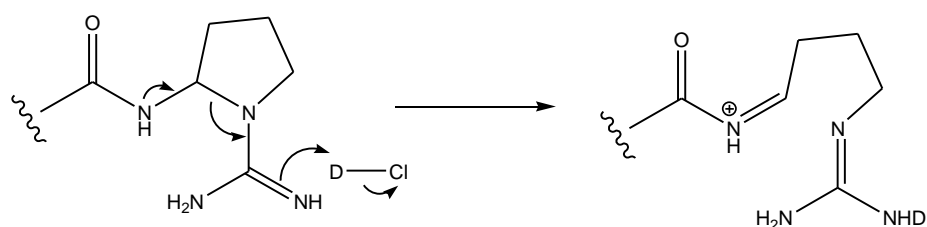
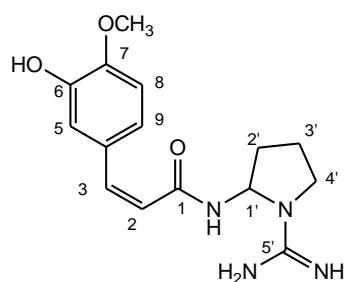


Figura I.2.11 Abertura do anel da pirrolidina em meio ácido.

Isocernumidina [(Z)-N-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acrilamida]



110

Da fracção **D4** foi isolada a isocernumidina (**110**), também uma amida derivada do ácido isoferúlico isolada pela primeira vez. As atribuições dos sinais dos espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN basearam-se nas técnicas de COSY-H,H, DEPT, HMQC e HMBC e encontram-se resumidos na Tabela I.2.6.

No espectro de massa de ESI-TOF-MS observa-se a presença de um sinal correspondente ao íão molecular $[M]^+$ a m/z 304,1531 u.m.a.

À semelhança do que foi observado para o composto **109**, o espectro de ^1H RMN do composto **110** apresenta, um padrão de fenilo 1,3,4-trissubstituído evidenciado pelos sinais dos prótons aromáticos a δ 7,08 ppm (*d*, $J_{5,9}=1,9$ Hz, H-5), a δ 6,91 ppm (*dd*, $J_{9,8}=8,3$ Hz, $J_{9,5}=1,8$ Hz, H-9) e δ 6,82 (*d*, $J_{8,9}=8,4$ Hz, H-8) os quais estão correlacionados por HMQC com os sinais dos átomos de carbono a δ 117,4 ppm, 123,7 ppm e 111,9 ppm, referentes aos átomos de carbono C-5, C-9 e C-8 do anel, respectivamente.

No entanto, o espectro de ^1H RMN do composto **110** difere do espectro do composto **109** pelo desvio dos dois sinais referentes aos prótons H-2 e H-3 da olefina dissustituída do fragmento propenóide para campo mais alto surgindo a δ 5,81 ppm (1H, *d*, $J_{8,7}=12,6$ Hz) e a δ 6,68 ppm (1H, *d*, $J_{7,8}=12,6$ Hz), respectivamente à semelhança do que foi observado para compostos análogos.⁷⁰ Observa-se também uma alteração do valor da constante de acoplamento entre eles para 12,6 Hz o que significa que os prótons H-2 e H-3 estão no composto **110** em posição *cis*. Os sinais dos prótons H-2 e H-3 encontram-se correlacionados por HMQC com os sinais dos átomos de carbono C-2 e C-3 a δ 120,6 e δ 140,9 ppm, respectivamente.

A presença de um grupo metoxilo na molécula é evidenciada pelo singuleto a δ 3,80 ppm (3H, *s*/) que corresponde por HMQC com o sinal a δ 56,4 ppm. O sinal a δ 3,80 ppm está correlacionado por HMBC com o sinal de C-7 a δ 150,0 ppm confirmando a posição de grupo metoxilo em C-7 à semelhança do que se observou para a cernumidina (**109**).

A presença de um grupo amida foi sugerida pela presença de um sinal a δ 171,1 ppm que se refere ao átomo de carbono do carbonilo em C-1, no espectro de ^{13}C RMN e foi confirmada pelas bandas de absorção a 1650 cm^{-1} e a 3221 cm^{-1} , devida às vibrações de alongamento das ligações(C=O) e (NH) no espectro no infravermelho de **110**.

A estrutura do fragmento isoferuílo foi esclarecida pelas correlações a longa distância observadas entre o próton H-5 e os sinais dos átomos do anel C-3 e C-9.

Tal como se observou para o composto **109**, o espectro de ^{13}C RMN do composto **5** apresenta quinze sinais. A experiência de DEPT permitiu a diferenciação dos sinais de ^{13}C RMN revelando a presença de um grupo metilo, três grupos metileno, seis grupos metino e cinco carbonos

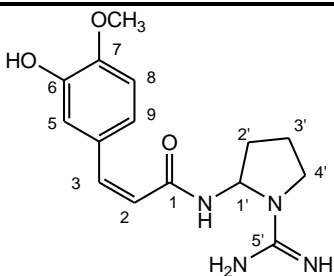
Discussão de Resultados

quaternários. Verificou-se a presença dos sinais característicos do fragmento *cis*-feruilo e os sinais dos restantes três grupos metileno, de um grupo metino e de um carbono quaternário foram atribuídos através de experiências bidimensionais 2D RMN e de desacoplamento.

A presença de um grupo guanidínico na molécula foi sugerida pela presença de um sinal, no espectro de ^{13}C RMN, a δ 156,7 ppm e confirmada pela coloração positiva após revelação com o reagente de Sakaguchi.¹⁴¹

O protão H-1' surge a δ 5,68 ppm (*d*, $J_{1',2'}=6,2$ Hz) e corresponde por HMQC ao sinal do metino (DEPT) a δ 65,3 ppm, surgindo a campo baixo o que sugere que se encontra desblindado pelo facto de estar ligado ao átomo de azoto da amida e ao átomo de azoto da guanidina.

Tabela I.2.6 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a isocernumidina (**110**) (CD_3OD), correlações COSY ^1H - ^1H e HMBC.

				
C	δ_c (CD_3OD)	δ_H (multiplicidade, <i>J</i> (Hz))	COSY (^1H - ^1H)	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	171,1	----	----	----
2	120,6	5,81 (<i>d</i> , $J_{2,3}=12,6$ Hz)	H-3	----
3	140,9	6,68 (<i>d</i> , $J_{3,2}=12,6$ Hz)	H-2	----
4	129,4	----	----	----
5	117,4	7,08 (<i>d</i> , $J_{5,9}=1,9$ Hz)	----	C ₃ , C ₉
6	147,1	----	----	----
7	150,0	----	----	----
8	111,9	6,82 (<i>d</i> , $J_{8,9}=8,4$ Hz)	H-9	C ₄ , C ₆
9	123,7	6,91 (<i>dd</i> , $J_{9,8}=8,3$ Hz, $J_{9,5}=1,8$ Hz)	H-8	----
OCH ₃	56,4	3,80 (<i>sl</i>)	----	C ₇
1'	65,3	5,68 (<i>d</i> , $J_{1',2'}=6,2$ Hz)	CH ₂ -2'	----
2'	33,0	A 2,20 (<i>m</i>) B 2,11 (<i>m</i>)	CH ₂ -1', CH ₂ -3',	----
3'	23,7	A 2,20 (<i>m</i>) B 2,05 (<i>m</i>)	CH ₂ -2', CH ₂ -4'	----
4'	48,2	A 3,44 (<i>m</i>) B 3,33 (<i>m</i>)	CH ₂ -3'	----
5'	156,7	----	----	----

À semelhança da cernumidina (**109**), a presença de um grupo pirrolidínico ligado ao átomo de azoto da amida foi confirmada pelos acoplamentos observados, no espectro de COSY-H,H entre o

protão do metino CH-1' e os prótons do grupo metileno CH₂-2' a δ 2,20 ppm (*m*) e δ 2,11 ppm (*m*), os quais estão correlacionados com os prótons do grupo metileno CH₂-3' a δ 2,20 ppm (*m*) e δ 2,05 ppm (*m*). Por último observa-se correlações entre estes e os prótons do grupo metileno CH₂-4' a δ 3,44 ppm (*m*) e δ 3,33 ppm (*m*).

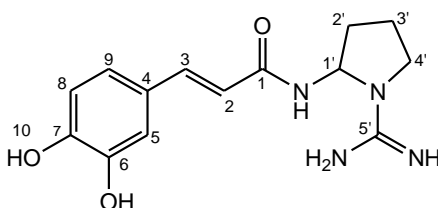
Com o objectivo de confirmar a subestrutura de *N*-(2-pirrolidinil)isoferulamida proposta foram realizadas experiências de desacoplamento no espectro de ¹H RMN. A irradiação do sinal do protão H-1' a δ 5,68 ppm (1H, *s*/) modificou apenas o sinal a δ 2,20 (m) relativo aos prótons H-2'A e H-3'A. A irradiação do sinal a δ 2,20 (m) simplificou o sinal do duplete H-1' (o qual se tornou singuleto, devido à ausência de acoplamento entre os prótons respectivos) e o multiplete de H-3'B. A irradiação do duplete do protão olefínico H-2 a δ 5,81 ppm simplificou o sinal do duplete H-3 o qual se tornou singuleto devido à ausência de acoplamento entre eles. A irradiação do sinal do duplete H-5 simplificou o duplete duplo de H-9.

O valor da rotação óptica específica do composto **110** é negativo ($[\alpha]_D^{20}$ -8,2° (c 0,37, metanol)) e, por comparação com os dados espectroscópicos dos compostos da família das amidas dos ácidos hidroxicinâmicos referidos na literatura, concluiu-se que neste trabalho se isolou, pela primeira vez, o composto (-)-(Z)-*N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida. À semelhança do que se observou para a cernumidina (**109**) o valor negativo da rotação óptica do composto **110** observado deve ser devido ao excesso enantiomérico da forma *levo*.

A análise comparativa efectuada entre os dados espectroscópicos dos compostos **109** e **110** permite desta forma concluir que a diferença observadas reside nos sinais correspondentes à olefina dissustituída, os quais para o composto **110** são consistentes com uma configuração Z. A ocorrência na Natureza de isomerismo E/Z é comum em derivados dos ácidos cinâmicos⁷⁰ e os valores das constantes do acoplamento entre os prótons H-2 e H-3 indicam uma configuração *E* para o composto **109** e uma configuração Z para o composto **110**.

Por outro lado, a conversão de um outro derivado do ácido cinâmico, o metil-*p*-hidroxi-*trans*-cinamato para o isómero *cis* termodinamicamente menos estável por fotoisomerização foi também observada, o que pode explicar a ocorrência do isomerismo E/Z observada.¹⁴⁴

Cernumidina B [(*E*)-*N*-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(3,4-di-hidroxifenil)acrilamida]

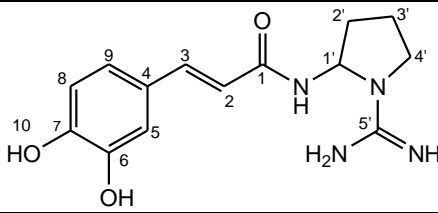


111

A análise espectroscópica dos espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN da fracção **D53**, por comparação com os compostos **109** e **110** mostrou que era constituída por cernumidina B (**111**). As atribuições dos sinais encontram-se resumidas na tabela I.2.7.

No espectro de ESI-TOF MS observa-se a presença de um sinal correspondente ao ião molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 291 u.m.a.

Tabela I.2.7 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a cernumidina B (**111**) (CD_3OD).

		
C	δ_c (CD_3OD)	δ_H (multiplicidade, J (Hz))
1	170,2	----
2	116,5	6,43 (d, $J_{2,3}=15,6$ Hz)
3	145,0	7,54 (d, $J_{3,2}=15,6$ Hz)
4	127,8	---
5	116,5	7,05 (sl)
6	147,0	---
7	149,4	---
8	115,2	6,80 (d, $J_{8,9}=8,2$ Hz)
9	122,7	6,95 (dl, $J_{9,8}=8,3$ Hz)
1'	65,4	5,80 (d, $J_{1',2'}=5,4$ Hz)
2'	33,4	A 2,34 (m)
		B 2,18 (m)
3'	23,8	A 2,34 (m)
		B 2,06 (m)
4'	48,1	A 3,60 (m)
		B 3,45 (m)
5'	156,8	----

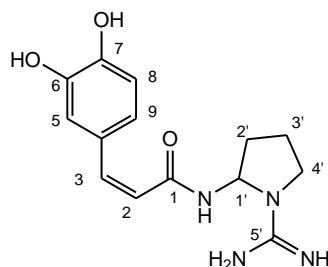
O espectro de ^1H RMN do composto **111** difere do espectro da cernumidina (**109**) pelo desaparecimento do singuleto a δ 3,86 ppm. Por outro lado, também não se observa, no espectro de ^{13}C RMN, o sinal a δ 56,4 ppm atribuível ao grupo metoxilo presente no carbono C-7 no espectro do composto **109**.

Tal como foi observado para o composto **109**, o espectro de ^1H RMN da cernumidina B (**111**) apresenta sinais atribuíveis aos prótons H-2 e H-3 de uma olefina *trans* dissubstituída do fragmento propenoide a δ 6,43 ppm (1H, *d*, $J_{2,3}=15,6$ Hz) e a δ 7,54 ppm (1H, *d*, $J_{3,2}=15,6$ Hz), respectivamente. No espectro de ^{13}C RMN, observam-se os dois sinais a δ 116,5 e 145,0 ppm que correspondem aos dois átomos da olefina C-2 e C-3.

Os sinais atribuíveis a um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído surgem no espectro de próton a δ 7,05 ppm (1H, *sl*, H-5), a δ 6,95 ppm (1H, *dl*, $J_{9,8}=8,3$ Hz, H-9) e a δ 6,80 ppm (1H, *d*, $J_{8,9}=8,2$ Hz, H-8) correspondentes aos três prótons do sistema ABX. No espectro de carbono observam-se os seis sinais a δ 115,2, 116,5, 122,7, 127,8, 147,0 e 149,4 ppm referentes aos seis átomos do anel aromático.

À semelhança dos compostos **109** e **110** a presença de um grupo amida na molécula foi evidenciada pelo sinal, no espectro de ^{13}C RMN, a δ 170,2 ppm do carbono C-5' e confirmada pelas bandas no espectro no infravermelho a 1651 cm^{-1} e a 3218 cm^{-1} . A presença de um grupo pirrolidínico ligado ao átomo de azoto da amida foi sugerida pelos sinais dos prótons H-1', H-2', H-3' e H-4' a δ 5,80 ppm (*d*, $J=5,4$ Hz), a 2,34 (*m*) e 2,18 (*m*), a 2,34 (*m*) e 2,06 (*m*) e 3,60 (*m*) e 3,45 (*m*), respectivamente. No espectro de carbono observa-se a presença de quatro sinais a δ 65,4, 33,4, 23,8 e 48,1 ppm correspondentes aos quatro átomos do anel pirrolidina. A existência de um grupo guanidina na molécula foi revelada pelo sinal a δ 156,8 ppm.

Isocernumidina B [(Z)-N-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)-3-(3,4-di-hidroxifenil)acrilamida]



112

Da fracção **D52** foi isolada a isocernumidina B (**112**), uma outra amida do ácido hidroxicinâmico.

À semelhança da cernumidina B (**111**), os espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN do composto **7** não apresentam os sinais referentes ao grupo metoxilo que surgiam no espectro da cernumidina (**109**) a δ 3,86 ppm e a 56,4 ppm.

No entanto, o espectro da isocernumidina B difere do espectro de protão do composto **6** pelo desvio para campo mais alto dos sinais referentes aos protões H-2 e H-3 e pelo valor da respectiva constante de acoplamento surgindo a δ 5,86 ppm (1H, *d*, $J_{8,7}=12,6$ Hz) e a δ 6,75 ppm (1H, *d*, $J_{7,8}=12,6$ Hz), o que indica a presença de uma olefina *cis* dissustituída. Observam-se, no espectro de carbono, os dois sinais relativos aos átomos de carbono C-2 e C-3 a δ 118,2 e δ 142,4 ppm, respectivamente.

À semelhança dos compostos **109**, **110** e **111** a presença dos sinais dos protões aromáticos a δ 7,13 ppm (*d*, $J_{5,9}=1,8$ Hz, H-5), a δ 6,97 ppm (*dd*, $J_{9,8}=8,4$ Hz, $J_{9,5}=1,7$ Hz, H-9) e δ 6,87 (*d*, $J_{8,9}=8,4$ Hz, H-8) evidencia a existência de um anel aromático 1,3,4,-trissustituído o que foi confirmado pelos seis sinais dos átomos de carbono correspondentes a δ 115,2, 116,5, 122,7, 128,2, 146,8 e 148,8 ppm.

A presença do sinal a δ 170,2 ppm no espectro de carbono e das bandas no IV a 1655 cm^{-1} e a 3334 cm^{-1} revelam a presença de um grupo amida ao qual está ligado um grupo pirrolidínico evidenciado pelos sinais dos protões H-1', H-2', H-3' e H-4' a δ 5,75 ppm (*d*, $J=6,3$ Hz), a 2,25 (*m*) e 2,10 (*m*), a 2,25 (*m*) e 1,92 (*m*) e 3,49 (*m*) e 3,38 (*m*), respectivamente. A existência de um anel pirrolidina é confirmada pelos sinais a δ 65,4, 33,4, 23,8 e 48,4 ppm no espectro de ^{13}C RMN.

A presença de um grupo guanidínico na molécula foi sugerida pela presença de um sinal, no espectro de ^{13}C RMN, a δ 156,8.

Hipótese Biossintética

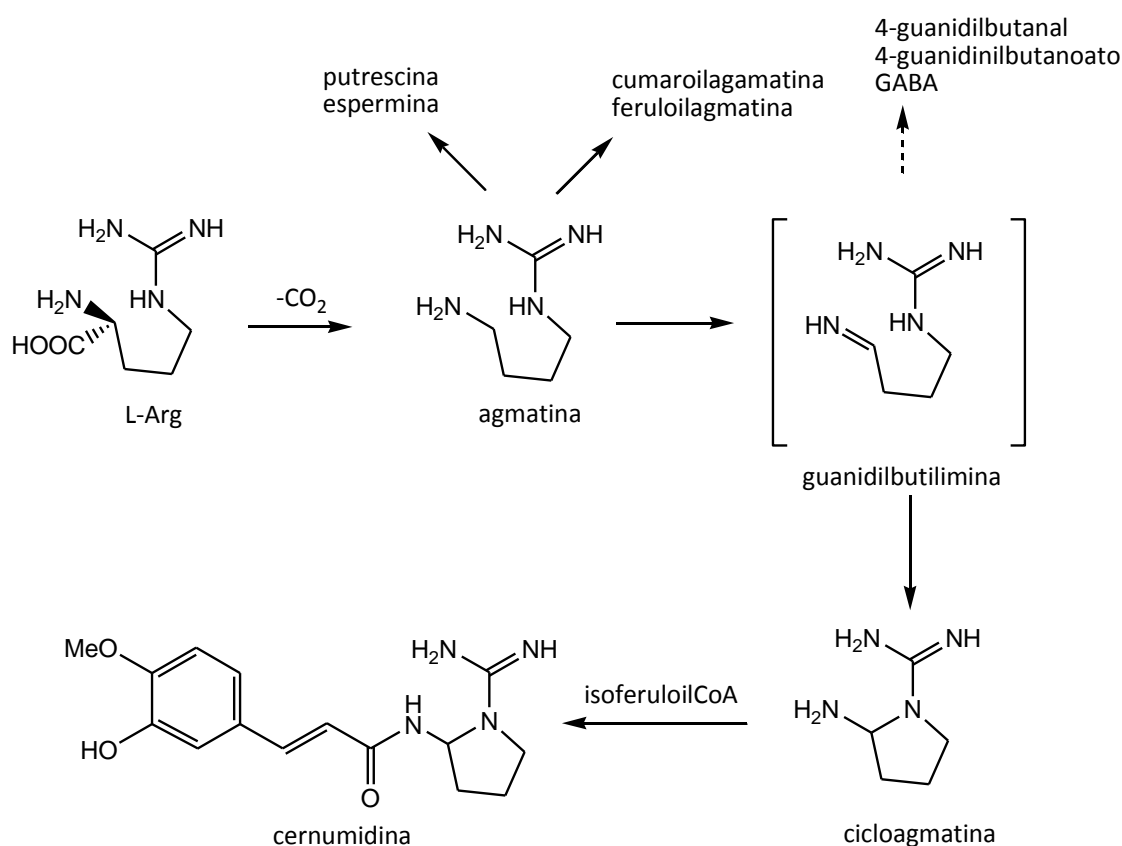
As estruturas das cernumidina (**109**), isocernumidina (**110**), cernumidina B (**111**) e isocernumidina B (**112**), que incluem uma unidade de pirrolidina, são inesperadas tendo em conta as estruturas conhecidas de amidas dos ácidos hidroxicinâmicos de guanidinas naturais.

Do ponto de vista biossintético, a via para as cernumidinas é intrigante devido à presença de uma unidade 2-aminopirrolidin-1-ilcarboxamida associada a amidas derivadas dos ácidos cinâmicos, que nunca tinha sido descrito anteriormente.

No que diz respeito ao fragmento 3-hidroxi-4-metoxifenilpropanoide (isoferúlico), a sua presença é comum em flavonóides, glicosídeos do ácido quínico, alcalóides acilados, entre outros e pode formar-se via a 4-*O*-metilação do ácido cafeico.

As amidas dos ácidos hidroxycinâmicos são formadas pela condensação de tioésteres hidroxycinamoil-CoA com feniletilaminas ou poliamidas. É conhecida a condensação de análogos do fragmento feruloílo e coumaroílo com a agmatina.⁶³

A desaminação oxidativa da arginina para originar 2-oxoarginina seguida da descarboxilação conduz ao guanidilbutanal que é o intermediário provável para a biossíntese de alcalóides guanidínicos (pirrolidinilcarboxamida) cíclicos. No entanto, a presença de um grupo amina na posição C-2 da pirrolidinilcarboxamida resultante presente nas cernumidinas não pode ser explicada por essa via (Figura I.2.12).



Figura

Figura I.2.12 Proposta de formação das cernumidinas.

Como alternativa, poderá ocorrer uma oxidação com remoção de hidreto da agmatina conduzindo à formação do intermediário guanidilbutilimina, o qual pode ciclar para formar a

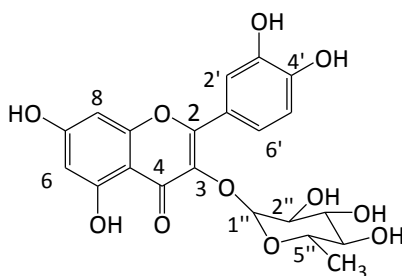
cicloagmatina, um derivado 2-aminopirrolidina. A cicloagmatina pode então ser estabilizada por acilação com o *E*- ou o *Z*-isoferuloilCoA ou com o *E*- ou o *Z*-cafeoilCoA para originar as cernumidinas ou as isocernumidinas (Figura I.2.12).

I.2.5.3 Elucidação estrutural dos compostos fenólicos

Como foi referido na introdução, a busca de novos compostos com actividade antibacteriana pode ser feita por uma das duas estratégias: proceder a um *design* de fármacos racional o que não constitui uma garantia de obtenção de moléculas eficientes ou, alternativamente, proceder a um *screening* da actividade antimicrobiana a partir de extractos brutos, ao fraccionamento bioguiado e determinação estrutural dos compostos.

Os extractos de diclorometano (**EBD**) e etanólico (**EBE**) de *Solanum cernuum* apresentaram uma actividade moderada para bactérias Gram+. Com o objectivo de compreender quais os compostos responsáveis pela actividade dos extractos, a actividade antibacteriana de alguns compostos isolados: (+)cicloeucalenona (**24**), 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e cernumidina (**109**) foi avaliada. Nenhum deles apresentou actividade para bactérias Gram+ ou Gram-. Estes resultados sugerem a presença de outros compostos activos, responsáveis pela actividade antimicrobiana. Sabe-se que os compostos fenólicos, que constituem uma parte do extracto etanólico, podem ser responsáveis pela actividade observada.¹⁴⁵ Para a identificação das moléculas responsáveis pela actividade, foram isolados e identificados os componentes maioritários da fracção **E** três flavonóides glicosilados, quercitrina (**1**), afzelina (**2**), hiperina (**113**) e o ácido ferúlico (**114**).

Quercitrina [2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxi-6-metil-tetra-hidro-2H-piran-2-iloxi)-4H-cromen-4-ona]



1

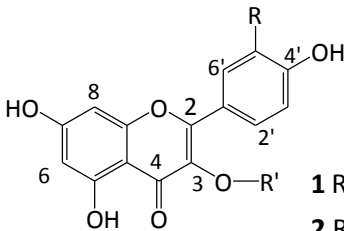
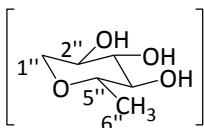
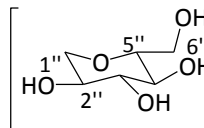
A análise do espectro de ¹H RMN da fracção **E3** resultante das duas separações do extracto etanólico por cromatografia de filtração por gel e por cromatografia de coluna em fase reversa eluída

Discussão de Resultados

com a mistura H₂O e MeOH, baseada em estudos comparativos com os resultados descritos para os flavonóides glicosilados^{146,147} mostrou que era constituída por quercitrina (**1**),¹⁴⁸ isolada anteriormente de *Solanum cernuum*.¹⁵

A quercitrina (**1**) foi visualizada, em placa de TLC de sílica gel 60, a 366 nm após pulverização com uma solução metanólica do éster β-etilamina do ácido difenilbórico (1%) seguida da solução etanólica de polietilenoglicol PEG-4000 (5%) com uma cor alaranjada, o que sugere a presença de um anel aromático 3',4'-di-hidroxilado na molécula.¹⁴⁹

Tabela I.2.8 Dados de ¹H RMN (400 MHz) e de ¹³C RMN (100 MHz) para a quercitrina (**1**), para a afzelina (**2**) e para a hiperina (**123**) (CD₃OD).

		<p>1 R=OH; R'=ramnose</p> <p>2 R=H; R'= ramnose</p> <p>123 R=OH; R'= galactose</p>				
1		2		123		
C	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
		(multiplicidade, J (Hz))			(multiplicidade, J (Hz))	
2	158,5	----	158,0	----	158,2	----
3	136,2	-----	133,9	----	135,5	----
4	179,6	-----	176,7	----	179,6	----
5	163,2	-----	161,1	----	162,9	----
6	99,8	6,19 (<i>d</i> , $J_{6,8}$ =1,7 Hz)	101,7	6,02 (<i>sl</i>)	99,7	6,20 (<i>d</i> , $J_{6,8}$ =1,9 Hz)
7	165,9	----	169,0	----	165,9	----
8	94,7	6,36 (<i>d</i> , $J_{8,6}$ =1,7 Hz)	95,9	6,13 (<i>sl</i>)	94,7	6,40 (<i>d</i> , $J_{8,6}$ =1,9 Hz)
9	159,3	----	156,7	----	159,4	----
10	105,9	----	101,4	----	105,0	----
1'	123,0	----	120,5	----	122,9	----
2'	116,9	7,33 (<i>d</i> , $J_{2',6'}$ =1,7 Hz)	130,3	7,73 (<i>d</i> , $J_{2',3'}$ =8,0 Hz)	116,0	7,84 (<i>d</i> , $J_{2',6'}$ =1,9 Hz)
3'	146,4	----	115,7	6,92 (<i>d</i> , $J_{3',2'}$ =8,0 Hz)	145,8	----
4'	149,8	----	161,1	----	149,8	----
5'	116,4	6,90 (<i>d</i> , $J_{5',6'}$ =8,3 Hz)	115,7	6,90 (<i>d</i> , $J_{5',6'}$ =8,0 Hz)	117,6	6,86 (<i>d</i> , $J_{5',6'}$ =8,5 Hz)
6'	123,0	7,30 (<i>dd</i> , $J_{6',5'}$ =8,3 Hz; $J_{6',2'}$ =1,8 Hz)	130,3	7,73 (<i>d</i> , $J_{6',5'}$ =8,0 Hz)	122,7	7,59 (<i>dl</i> , $J_{6',5'}$ =8,7 Hz)
1''	103,5	5,34 (<i>d</i> , J =0,8 Hz)	102,1	5,35 (<i>sl</i>)	105,2	5,17 (<i>d</i> , J =7,8 Hz)
2''	72,1*	4,21 (<i>dl</i> , J =1,3 Hz)	70,5	4,24 (<i>sl</i>)	73,0	
3''	72,0*	3,74(<i>dd</i> , J =3,2 Hz; J =9,3 Hz)	70,8	3,75 (<i>dd</i> , J = 2,2 Hz, J = 6,2 Hz)	74,9	
4''	73,2	3,39 (<i>m</i>)	71,9	3,39 (<i>m</i>)	69,8	3,30-3,80 (<i>m</i> , 6H)
5''	71,9	3,39 (<i>m</i> , $J_{5'',6''}$ =6,0 Hz)	71,9	3,39 (<i>m</i>)	69,9	
6''	17,6	0,93 (<i>d</i> , $J_{6'',5''}$ =6,0 Hz)	16,2	0,92 (<i>d</i> , J =4,1 Hz)	61,5	

*-sinais permutáveis

No espectro de MALDI/MS em modo positivo observa-se a presença de um sinal que corresponde ao íão $[M+2H]^+$ a m/z 450 u.m.a. que surge com uma intensidade muito baixa. O íão $[M+H]^+$ é de seguida fragmentado dando origem a um íão de massa m/z 303 u.m.a. $[(M+H)\text{-ramnose}]^+$, o qual corresponde à quercetina $C_6H_7O_5$ acrescido de uma unidade, à semelhança do descrito na literatura.¹⁵⁰

No espectro de 1H RMN, surgem dois sinais na região dos prótons aromáticos a δ 6,19 ppm (d , $J_{6,8}=1,7$ Hz) e 6,36 ppm (d , $J_{8,6}=1,7$ Hz) que correspondem aos prótons H-6 e H-8. O valor da constante de acoplamento de 1,7 Hz indica que estão posicionados de acordo com uma orientação *meta*, o que sugere a presença de um anel A 5,7-dissubstituído, à semelhança do que foi descrito para a quercitrina (Tabela I.2.8).¹⁴⁸ A presença de grupos hidroxilo na molécula foi confirmada pela banda de absorção muito intensa a 3400 cm^{-1} no espectro no infravermelho.

A presença de uma cetona α,β -insaturada no anel C foi evidenciada pelo sinal, no espectro de ^{13}C RMN a δ 179,6 ppm e foi confirmada, no espectro no infravermelho, pela banda do carbonilo (ν C=O) a 1656 cm^{-1} . A existência de uma ponte de hidrogénio entre este grupo e o hidroxilo em C-5 foi também sugerida pela frequência da banda referente ao grupo hidroxilo $\nu(OH)$ a 3400 cm^{-1} e pela banda a 1609 cm^{-1} atribuível ao grupo carbonilo.¹⁵¹

No espectro de ^{13}C RMN existem nove sinais devidos aos anéis A e C a valores de δ 158,5, 136,2, 179,6, 163,2, 99,8, 165,9, 94,7, 159,3 e 105,9 ppm os quais correspondem aos átomos de carbono C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9 e C-10, respectivamente.¹⁵²

Para além dos sinais referentes aos anéis A e C, observam-se também, no espectro de 1H RMN três sinais a δ 7,33 ppm (d , $J_{6',2'}=1,8$ Hz), 7,30 (dd , $J_{2',3'}=8,3$ Hz, $J_{2',6'}=1,8$ Hz) e 6,90 (d , $J_{3',2'}=8,3$ Hz') atribuíveis aos prótons H-2', H-6' e H-5', respectivamente, os quais são característicos de um sistema de spin ABX sugerindo a presença de um anel aromático B 1',3',4'-trissubstituído.¹⁵³

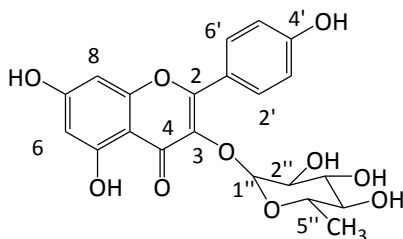
O espectro de ^{13}C RMN apresenta seis sinais referentes aos átomos de carbono do anel B a δ 123,0, 116,9, 146,4, 149,8, 116,4 e a 123,0 ppm os quais correspondem aos átomos de carbono C-1', C-2', C-3', C-4' e C-5' e C-6', respectivamente, tal como descrito para a quercitrina.¹⁵²

A presença de uma unidade de carbo-hidrato foi evidenciada pelo duplete a δ 5,34 ppm (d , $J=0,8$ Hz) correspondente ao próton anomérico H-1'', no espectro de 1H RMN. O valor da constante de acoplamento indica a orientação α do átomo de hidrogénio na posição anomérica.¹⁵⁴ A este sinal

corresponde um sinal, no espectro de ^{13}C RMN a δ 103,5 ppm, à semelhança do que foi descrito para a quercitrina.¹⁴⁷

A presença de ramnose foi confirmada pela presença de um duplete, no espectro de próton, a δ 0,93 ppm (3H, *d*, $J_{6'',5''}=6,0$ Hz) atribuível ao metilo $\text{CH}_3\text{-}6''$, e pelos cinco restantes sinais do carbohidrato, no espectro de ^{13}C RMN, a δ 73,2, 72,1, 72,0, 71,9 e 17,6 ppm os quais correspondem aos cinco átomos de carbono da ramnose.¹⁵⁵

Afelina [5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-(3,4,5-tri-hidroxi-6-metil-tetra-hidro-2*H*-piran-2-iloxi)-4*H*-cromen-4-ona]



2

O segundo flavonóide glicosilado isolado da fracção **E4** por cromatografia de coluna em fase reversa utilizando a mistura $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ foi a afzelina (**2**), a qual fora já isolada de *Solanum cernuum* Vell.¹⁵

As atribuições dos sinais dos espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN estão apresentadas na Tabela I.2.8. Foram também realizadas experiências de HMQC e de HMBC.

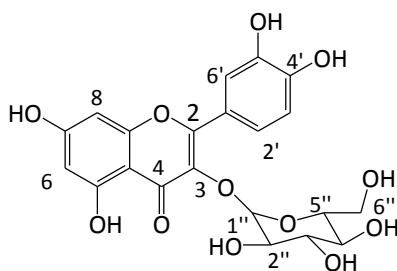
O espectro de ^1H RMN em metanol deuterado do composto **2** difere do espectro do composto **1** pela presença de dois dupletos que integram para dois prótons a δ 7,73 ppm e a δ 6,92 ppm e correspondem à sobreposição dos sinais dos prótons H-2' e H-6' e dos sinais dos prótons H-3' e H-5', respectivamente do anel B. Estes sinais estão de acordo com a presença de um sistema de spin AA'BB' sugerindo a presença de um anel aromático B hidroxilado 4'-substituído¹⁴⁸ e correspondem (por HMQC) aos sinais dos carbonos a δ 130,3 ppm (C-2' e C-6') e a δ 115,7 ppm (C-3' e C-5'), respectivamente. A atribuição do desvio químico do átomo de carbono C-4' a δ 161,1 ppm foi feita

com base nas correlações a longa distância observadas entre este átomo e os restantes prótons do anel B.

O singuleto largo a δ 5,35 ppm correspondente ao próton anomérico H-1'', no espectro de ^1H RMN, ao qual corresponde um sinal, por HMQC, a δ 102,1 ppm, o duplete, no espectro de próton, a δ 0,92 ppm (d , $J_{6'',5''}=4,1$ Hz) atribuível ao metilo $\text{CH}_3\text{-6''}$ o qual está correlacionado por HMQC com o sinal a δ 16,2 ppm e dos três sinais dos restantes quatro grupos metino indicaram a presença de ramnose, à semelhança do descrito para a afzelina.¹⁴⁸

A localização da ramnose na molécula foi esclarecida pela correlação de HMBC observada entre o sinal do próton anomérico H-1'' a δ 5,35 ppm (s) e o sinal do carbono C-3 a δ 133,9 ppm e a estrutura foi confirmada pelas correlações a longa distância observadas entre o sinal do próton anomérico H-1'' e os sinais dos átomos de carbono C-2'' e C-3''. Também se observam sinais entre os prótons do metilo $\text{CH}_3\text{-6''}$ e os sinais dos átomos de carbono C-4'' e C-5''.

Hiperina [2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)-tetra-hidro-2H-piran-2-iloxi)-4H-cromen-4-ona]



113

Da fracção **E2** foi isolada a hiperina (**10**), um outro flavonóide glicosilado. A identificação deste composto foi baseada em estudos comparativos com os resultados descritos para flavonóides glicosilados.^{153,156,157}

As atribuições dos sinais dos espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN estão apresentadas na Tabela I.2.8.

No espectro de ^1H RMN, surgem dois sinais na região dos prótons aromáticos a δ 6,20 ppm (d , $J_{6,8}=1,9$ Hz) e 6,40 ppm (d , $J_{8,6}=1,9$ Hz) que correspondem aos prótons H-6 e H-8. O valor da constante

de acoplamento de 1,9 Hz indica que têm posição relativa *meta*, o que sugere a presença de um anel A 5,7-dissubstituído, à semelhança do que foi descrito para a quercetina.¹⁴⁸

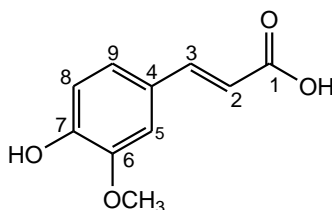
No espectro de ^{13}C RMN existem quinze sinais devidos aos anéis A e C a valores de δ 158,2, 135,5, 179,6, 162,9, 99,7, 165,9, 94,7, 159,4 e 105,0 ppm os quais correspondem aos átomos de carbono C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9 e C-10, respectivamente, à semelhança do descrito para a hiperina.¹⁵⁷

Existem também, no espectro de ^1H RMN três sinais a δ 7,84 ppm (*d*, $J_{2',6'}=1,9$ Hz), 7,59 (*dl*, $J_{6',5'}=8,7$ Hz) e 6,86 (*d*, $J_{5',6'}=8,5$ Hz) atribuíveis aos prótons H-2', H-6' e H-5', respectivamente, os quais são característicos de um sistema de spin ABX sugerindo a presença de um anel aromático B 1',3',4'-trissubstituído, tal como foi descrito para a hiperina.¹⁵⁷

O espectro de ^{13}C RMN apresenta ainda seis sinais atribuíveis aos átomos de carbono do anel B a δ 123,0, 116,0, 145,8, 149,8, 117,6 e a 122,7 ppm os quais correspondem aos átomos de carbono C-1', C-2', C-3', C-4', C-5' e C-6', respectivamente.

Os espectros de próton e de carbono do composto **113** diferem dos do composto **1** pela presença de um unidade de galactose evidenciada pelo duplete a δ 5,17 ppm (*d*, $J=7,8$ Hz) correspondente ao próton anomérico H-1'', no espectro de ^1H RMN ao qual corresponde um sinal, no espectro de ^{13}C RMN, a δ 105,2 ppm (C-1'') à semelhança do que foi descrito para a hiperina.¹⁵⁷ A presença desta unidade de carbo-hidrato foi confirmada pelos cinco restantes sinais, no espectro de ^{13}C RMN a δ 61,5, 69,9, 69,8, 73,0, 74,9, ppm os quais correspondem aos cinco átomos de carbono.^{156,157}

Ácido ferúlico [ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilico]



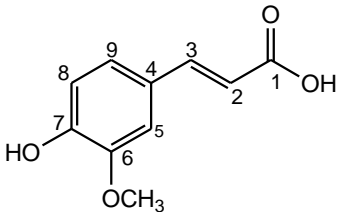
114

Discussão de Resultados

Das frações **E42-E44** foi isolado, por cromatografia de coluna em sílica gel de fase reversa, o composto **114**, cuja estrutura foi identificada com base em estudos comparativos com os dados espectroscópicos descritos para os ácidos hidroxicinâmicos^{158,159} revelou ser a do ácido ferúlico (**114**).¹⁶⁰

O espectro de ¹H RMN apresenta, à semelhança dos ácidos cinâmicos 3,4-dissubstituídos, os sinais atribuíveis aos prótons H-2 e H-3 de uma olefina dissubstituída do fragmento propenoide a δ 6,38 ppm (1H, *d*, $J_{2,3}$ =15,7 Hz) e a δ 7,40 ppm (1H, *d*, $J_{3,2}$ =15,7 Hz), respectivamente. O valor da constante de acoplamento de 15,6 Hz significa que os prótons H-2 e H-3 estão em posição *trans*. Aos sinais dos prótons H-2 e H-3 correspondem os sinais a δ 118,1 ppm e δ 145,5 ppm, respectivamente, à semelhança de outros derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (Tabela I.2.9).⁷⁰

Tabela I.2.9 Dados de ¹H RMN (400 MHz) e de ¹³C RMN (100 MHz) para o ácido ferúlico (**114**) (CD₃OD).

		
C	δ_c	δ_H (multiplicidade, <i>J</i> (Hz))
1	172,3	----
2	118,1	6,38 (<i>d</i> , $J_{2,3}$ =15,7 Hz)
3	149,3	7,40 (<i>d</i> , $J_{2,3}$ =15,7 Hz)
4	128,3	----
5	111,7	7,00 (<i>d</i> , $J_{5,9}$ =1,7 Hz)
6	150,1	----
7	145,5	----
8	116,5	6,76 (<i>d</i> , $J_{8,9}$ =8,1 Hz)
9	123,7	6,91 (<i>dl</i> , $J_{9,8}$ =8,3 Hz)
10	56,5	3,88 (<i>s</i>)

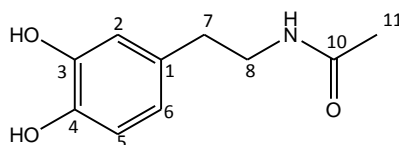
Existem também, no espectro de próton, os sinais atribuíveis a um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído a δ 7,00 ppm (1H, *d*, $J_{5,9}$ =1,7 Hz, H-5), a δ 6,91 ppm (1H, *dl*, $J_{9,8}$ =8,3 Hz, H-9) e a δ 6,76 ppm (1H, *d*, $J_{8,9}$ =8,1 Hz, H-8) correspondentes aos três prótons aromáticos do sistema ABX. A estes sinais correspondem os sinais dos átomos de carbono a δ 111,7 ppm, a δ 116,5 ppm e a δ 123,7 ppm, referentes aos átomos de carbono C-5, C-8 e C-9 do anel, respectivamente.¹⁶¹

Observa-se, no espectro de ¹H RMN, a presença de um sinal que surge na forma de singuleto largo a δ 3,88 ppm (3H, *s*) e no espectro de carbono observa-se o sinal a δ 56,5 ppm, correspondente ao átomo de carbono do grupo metoxilo em C-6.

Discussão de Resultados

A presença de um grupo ácido na molécula foi evidenciada pelas bandas de absorção intensa a 3406 cm^{-1} e a 1657 cm^{-1} devida às vibrações de alongamento do hidroxilo e do grupo carbonilo (C=O) no espectro no infravermelho de **9**, e pela presença, no espectro de ^{13}C RMN, de um sinal a δ 172,3 ppm referente ao átomo de carbono do carbonilo em C-1.

***N*-acetildopamina** [*N*-(3,4-di-hidroxifenetil)acetamida]



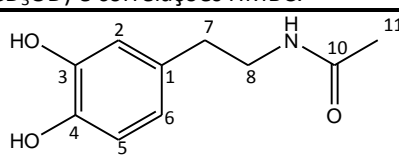
115

Ainda da fracção **E42-E44** do extracto etanólico (**EBE**) foi isolada a *N*-acetildopamina (**NADA**, **115**), um derivado acetilado da dopamina, o qual nunca tinha sido encontrado em plantas.

A análise do espectro de ^1H RMN do composto **115**, baseada em estudos comparativos com os dados espectroscópicos descritos revelou a presença da *N*-acetildopamina.¹⁶² As atribuições dos sinais dos espectros de ^{13}C RMN basearam-se em experiências de DEPT, HMQC e HMBC e estão apresentados na Tabela I.2.10).

No espectro de massa de alta resolução observa-se a presença de um sinal a m/z 218,0791 u.m.a. que corresponde ao ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$, o qual está de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$.

Tabela I.2.10 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz) para a *N*-acetildopamina (**115**) (CD_3OD) e correlações HMBC.

			
Nº	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz))	HMBC (^1H - ^{13}C)
1	132,0	----	----
2	116,8	6,63 (d, $J_{2,6}=0,9$ Hz)	C ₄ , C ₆ , C ₇
3	146,2	----	----
4	144,7	----	----
5	116,4	6,67 (d, $J_{5,6}=7,9$ Hz)	C ₃ , C ₆
6	121,0	6,51 (dl, $J_{6,5}=6,8$ Hz)	C ₂ , C ₄ , C ₇
7	35,8	2,61 (t, $J_{7,8}=7,3$ Hz)	C ₁ , C ₂ , C ₆ , C ₈
8	42,4	3,30 (m)	C ₁ , C ₇ , C ₁₀
9	----	----	----
10	173,2	----	----
11	22,5	1,89 (sl)	C ₁₀

O espectro de ^1H RMN apresenta um padrão de grupo fenilo 1,3,4-trissubstituído evidenciado pelos sinais a δ 6,67 ppm (1H, *d*, $J_{5,6}=7,9$ Hz, H-5), a δ 6,63 ppm (1H, *d*, $J_{2,6}=0,9$ Hz, H-6) e δ 6,51 ppm (1H, *d*, $J_{7,5}=8,0$ Hz, H-6) correspondentes aos três prótons aromáticos do sistema ABX. Estes sinais estão correlacionados por HMQC com os sinais dos átomos de carbono a δ 116,8 ppm, δ 116,4 ppm e δ 121,0 ppm, referentes aos átomos de carbono C-2, C-5 e C-6 do anel, respectivamente. O sinal do próton H-2 apresenta correlações por HMBC com os sinais dos átomos de carbono C-4, C-6 e C-7 a δ 144,7 ppm, a δ 121,0 ppm e a δ 35,8 ppm, respectivamente. Por outro lado, observam-se correlações a longa distância entre o sinal do próton H-5 e os sinais dos átomos de carbono C-3 e C-6 a δ 146,2 ppm e a δ 121,0 ppm, respectivamente.

O espectro de ^{13}C RMN do composto **115** apresenta dez sinais. A experiência de DEPT permitiu a diferenciação dos sinais de ^{13}C RMN revelando a presença de um grupo metilo, de dois grupos metileno, três grupos metino e quatro carbonos quaternários. Verificou-se a presença dos sinais característicos de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído e os sinais dos restantes dois grupos metileno, de um grupo metilo e de um carbono quaternário foram atribuídos através de experiências bidimensionais 2D RMN e de desacoplamento.

Observa-se, no espectro de ^1H RMN, um tripleto a δ 2,61 ppm (2H, *t*, $J_{3,2}=7,3$ Hz) atribuíveis aos prótons do grupo metileno CH_2 -7 o qual corresponde por HMQC ao sinal a δ 35,8 ppm do átomos de carbono C-7. A atribuição do sinal do segundo grupo metileno CH_2 -8, no espectro de ^1H RMN, só foi possível através da correlação com o sinal do átomo de carbono a δ 42,4 ppm na experiência bidimensional de HMQC, uma vez que se sobrepõe ao sinal do metanol residual a δ 3,30 ppm.

O espectro no infravermelho de **115** apresenta uma banda de absorção intensa a 1640 cm^{-1} , devida às vibrações de alongamento $\nu(\text{C}=\text{O})$ da amida e no espectro de ^{13}C RMN observa-se um sinal a 173,2 ppm que se refere ao átomo de carbono do carbonilo em C-10. A presença de um grupo metilo em C-11 foi evidenciada pelo singuleto a δ 1,89 ppm (3H, *s*/), no espectro de ^1H RMN e pelo sinal no espectro de ^{13}C RMN a 22,5 ppm.

A estrutura da *N*-acetildopamina foi esclarecida pelas correlações a longa distância observadas entre o metileno em C-8 e o sinal do átomo do anel C-1, do metileno em C-7 e do carbonilo em C-10. Por outro lado, a proximidade entre o metileno em C-7 e o anel aromático trissubstituído foi evidenciada pelas correlações observadas entre este sinal e os sinais dos átomos de carbono C-1, C-2 e

C-6. Observam-se também correlações a longa distância entre o sinal do metilo em CH₃-11 e o carbonilo em C-10.

De modo a confirmar a estrutura e a questionar a possível estrutura da *N*-acetil-6-aminoindolina, foram realizadas experiências de desacoplamento por NOESY. Observou-se que a irradiação do grupo metileno a δ 2,61 ppm provocava alterações nos sinais dos prótons H-2 e do duplete duplo H-6, mantendo inalterado o sinal do próton H-5, o que veio rejeitar a existência de um anel de indolina e apoiar um sistema aberto de feniletilamina.

Como foi mencionado anteriormente, a presença de *N*-acetildopamina em espécies vegetais é referida aqui pela primeira vez. Sabe-se que o composto **115** é um agente da cutícula dos insectos.^{163,164} Por isso, a presença de NADA no extracto etanólico de *Solanum cernuum* foi investigada com maior detalhe. Esta planta é o único hospedeiro do pequeno escaravelho *Platyscytus decempunctatus* que vive ao longo do seu ciclo de vida na face inferior da folha desta espécie. Curiosamente outras espécies desta planta que crescem na mesma área geográfica não são hospedeiros dos escaravelhos.

Apesar deste estudo não se centrar nesta observação, que justifica uma investigação posterior, um ensaio realizado mais tarde, com apenas uma amostra, mostrou a ausência do composto **115** na planta. Este resultado não é suficiente para determinar inequivocamente que o composto não é produzido pela planta.

Por outro lado, a identificação do ácido ferúlico (**114**) e de *N*-acetildopamina (**115**) levou a questionar a origem destes dois metabolitos e a levantar a hipótese de ambos poderem também ser produtos da hidrólise, que pode ter ocorrido durante os sucessivos processos de isolamento, da *N*-*trans*-feruloildopamina (**46**) que foi isolada de *Solanum lycopersum* cv. Rutdgers, tal como se referiu anteriormente.⁶⁷

Neste trabalho está ainda a ser avaliada a actividade farmacológica do composto **115**: a actividade anti-inflamatória, a actividade antiproliferativa e a actividade para doenças neurodegenerativas.

Capítulo I.3

Actividade biológica dos compostos isolados

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

I.3.

Após o fraccionamento bioguiado foi avaliada a actividade anti-inflamatória, nos modelos de contorção induzida pelo ácido acético e edema de pata induzido por carragenina e para moléculas alvo pertencentes à rede de sinalização: as citoquinas, a enzima ciclo-oxigenase 2, a sirtuína 1, o factor TNF- α e a interleuquina-8, a toxicidade aguda e a actividade antitumoral dos diferentes metabolitos para várias linhas de células tumorais. A actividade antibacteriana também foi avaliada.

I.3.1. Actividade anti-inflamatória

I.3.1.1 Modelo de contorção induzida por ácido acético

Com o objectivo de saber qual(is) o(s) composto(s) responsável(is) pela actividade anti-inflamatória do extracto de diclorometano foi avaliada a actividade anti-inflamatória da (+)-cicloeucaletona (**24**) e da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) utilizando o modelo de contorção induzida por ácido acético. Os resultados encontram-se sumariados na Tabela I.3.1.

Tabela I.3.1 Efeito do extracto de diclorometano das folhas de *S. cernuum* Vell. (DCE), da (+)-cicloeucaletona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e metamizole na contorção induzida por ácido acético. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$ versus grupo controle.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Numero de contorsões (média \pm st)	% inibição
(+)-cicloeucaletona (24)	50	p.o.	23,8 \pm 7,3	56,4*
	100		4,3 \pm 0,8**	88,3**
	200		4,1 \pm 2,6**	87,7**
(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107)	10	p.o.	34,0 \pm 4,8	37,7
	50		24,7 \pm 2,3*	53,0*
	100		21,0 \pm 2,1*	63,0*
metamizole	200	p.o.	5,2 \pm 3,3**	90,5**
Control (solução, 0,9%)	10 mL	p.o.	54,6 \pm 8,3	0

Anova F (4, 39) = 22.36 $p < 0,0001$. Teste Dunnet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A análise dos resultados permitiu concluir que a (+)-cicloeucaletona (**24**) e a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) apresentaram percentagens de inibição de 56,4% e de 53,0%, para a dose de 50 mg/Kg. A actividade dos dois compostos também depende da dose administrada, apresentando valores significativos de 88,3% para o composto **24** e de 63% para o composto **107** a uma dose de 100

mg/Kg. O metamizole, composto referência, apresentou um valor de inibição de 90,5% a uma dose de 200 mg/Kg semelhante ao apresentado pela (+)-cicloeucalenona (**24**).

Esta inibição da contorção produzida pelo extracto de diclorometano (**EBD**) e pelos compostos **24** e **107** pode ser consequência de um efeito anti-inflamatório ou de uma acção no sistema sensorial na condução dos sinais da dor.

A actividade anti-inflamatória da cernumidina (**109**) utilizando este modelo foi também avaliada mas não apresentou actividade significativa.

1.3.1.2 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

Para confirmar o efeito anti-inflamatório, as actividades da (+)cicloeucalenona (**24**) e a (+)24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) foram avaliadas, através do ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina o qual tem sido aceite como forma para testar agentes anti-inflamatórios.¹⁶⁵ Este modelo em ratos tem duas fases distintas: uma fase inicial que começa imediatamente após a injeção de carragenina e uma fase posterior que se inicia 6 h após a injeção e termina 72 horas após a injeção. Observa-se um pico inflamatório entre as 48 e as 72 horas.^{166,167}

Na primeira fase são libertados mediadores tais como a serotonina, a fosfolipase A₂ (PLA₂), a histamina, as quininas, os metabolitos do ácido araquidónico (prostaglandinas e leucotrienos) e óxido nítrico (NO). Na fase posterior intervêm os metabolitos do ácido araquidónico os quais produzem edema dependendo da mobilização dos neutrófilos.^{168,116} A resposta inflamatória aguda caracteriza-se por um aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular que conduzem à formação de edema, como resultado de extravasamento de fluidos e de proteínas e de acumulação de leucócitos no local de inflamação.¹⁶⁷ Após o estímulo inflamatório, os mastócitos são estimulados a produzir histamina, que contribui para a vasodilatação e permeabilidade vascular. O estímulo inflamatório também conduz à activação e secreção dos mediadores que incluem bradicinina (que está envolvida no mecanismo de dor e contracção do músculo) e os metabolitos do ácido araquidónico como as prostaglandinas e leucotrienos.

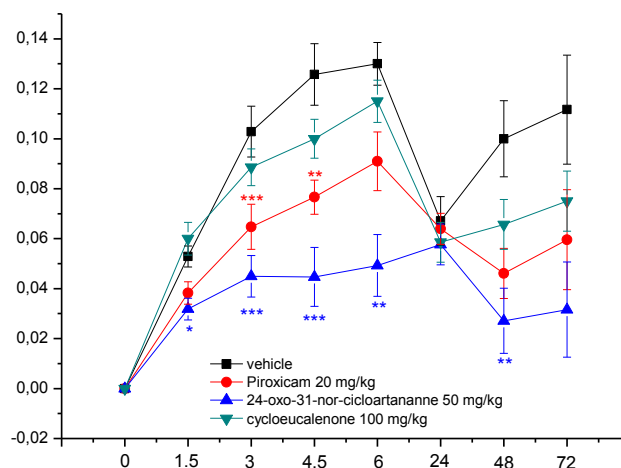


Figura I.3.1. Efeito da (+)-cicloeucaletona (**24**) e da (+)-24-oxo-31-nor-cicloartanona (**107**) no edema da pata induzido por carragenina expresso como edema da pata (mL) em função do tempo (horas) após indução da inflamação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Teste de Duncan, estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo. ANOVA, $p < 0,01$.

A Figura I.3.2, que apresenta os resultados do ensaio realizado, mostra que o composto **107** inibiu significativamente o edema da pata induzido por carragenina em todas as fases do processo inflamatório, a uma dose de 50 mg/Kg (*p.o.*), com um perfil idêntico mas mais eficiente do que o controle positivo piroxicam (fármaco anti-inflamatório não esteroide).

O composto **107** mostrou ser particularmente activo 4,5 horas após a indução da inflamação, altura em que ocorre a produção de COX-2 e a secreção de prostaglandinas. Ambos os compostos inibiram a segunda fase do processo de inflamação que ocorre entre as 48 e as 72 horas.

O facto do composto **107** inibir todas as fases do processo inflamatório pode resultar de uma redução da síntese e/ou secreção dos mediadores na fase inflamatória anterior como a histamina e bradicinina ou o efeito inibitório a jusante que interfere com a produção de prostaglandinas e leucotrienos e subsequentemente com a inibição dos leucócitos.

I.3.2. Actividade para moléculas alvo pertencentes à rede de sinalização

I.3.2.2 Expressão de COX-2

Foi então examinado o efeito da (+)-cicloeucalenona (**24**) e da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) na expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), responsável pela síntese de prostaglandinas, pelo método de *western blotting*. A figura I.3.2 apresenta os resultados deste ensaio.

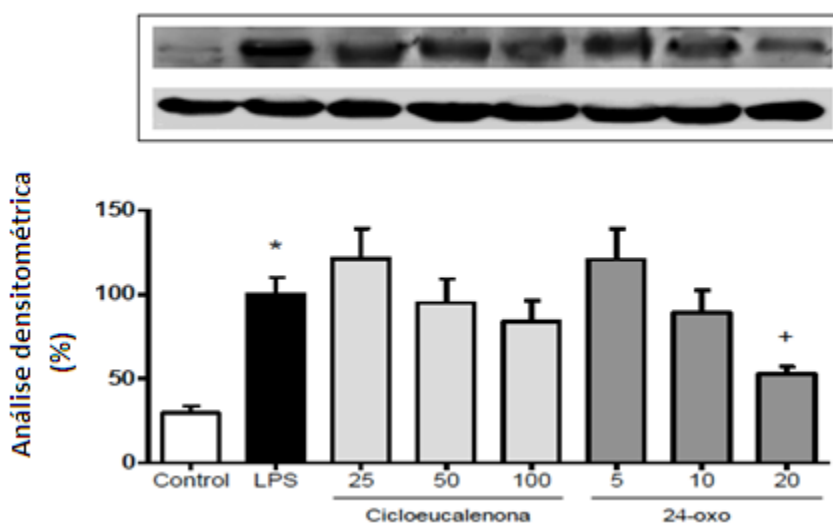


Figura I.3.2 Efeito da (+)-cicloeucalenona (**24**) e da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) na expressão proteica da COX-2 em células estimuladas THP-1. (t de Student. *p<0,05 vs Controle; +p<0,05 vs grupo LPS).

Observou-se que os compostos **24** e **107** reduzem a expressão da COX-2 identificada em cultura de sobrenadantes de macrófagos diferenciados da linha monocítica THP-1 e estimulados com LPS ($1\mu\text{g mL}^{-1}$). A inibição provocada pela (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) era mais acentuada do que a da (+)-cicloeucalenona (**24**) (Figura I.3.2).

Esta inibição observada da expressão da COX-2 pela (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) confirma que o efeito analgésico e anti-inflamatório observado anteriormente para o composto **107** pode ocorrer através da inibição da expressão da COX-2, podendo constituir uma estratégia útil para tratar o componente inflamatório.

I.3.2.2 Actividade da Sirtuína 1

As sirtuínas, uma família de enzimas que catalisam a desacetilação dos resíduos de lisina em diversas proteínas, emergiram recentemente como as novas ligações moleculares entre o envelhecimento e várias patologias incluindo as do sistema imunitário.¹⁶⁹

A família das sirtuínas compreende a sete membros. Nos mamíferos a sirtuína 1 afecta a sobrevivência e a proliferação celular, o período de vida e a inflamação através da desacetilação das proteínas envolvidas nestes processos. Com base neste conhecimento, a evidência sugere uma função da sirtuína 1 no controle da expressão de alguns mediadores da inflamação.⁴⁰

Verificou-se que a desacetilação de alguns factores de transcrição era dependente de sirtuínas e foi demonstrada especificamente a função da sirtuína 1 ao interagir fisicamente com a subunidade Re1A/p65 do factor NF- κ B e inibir a transcrição ao desacetilar Re1A/p65 na lisina 310. Este factor pode por sua vez regular a expressão de muitos genes envolvidos em citoquinas, incluindo TNF- α , e muitos outros reguladores de processo inflamatório.^{38,41} São conhecidos muitos produtos naturais que regulam a actividade da sirtuína 1, alguns dos quais com uma estrutura de terpenóide.¹⁷⁰

Foi estudado o efeito da (+)-cicloeucalenona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e da cernumidina (**109**) com doses de 0,5, 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na actividade da sirtuína 1 utilizando uma técnica fluorimétrica (Figura I.3.4). A actividade da SIRT1 está expressa como % do controle (C) apresentado na Figura I.3.3.

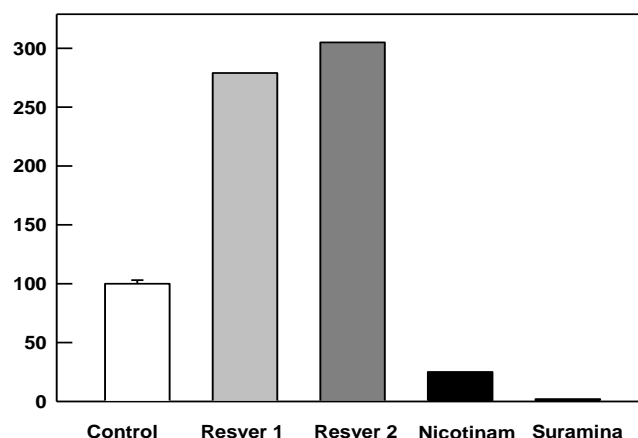


Figura I.3.3 Efeito dos diferentes controles utilizados na actividade SIRT1 (%).

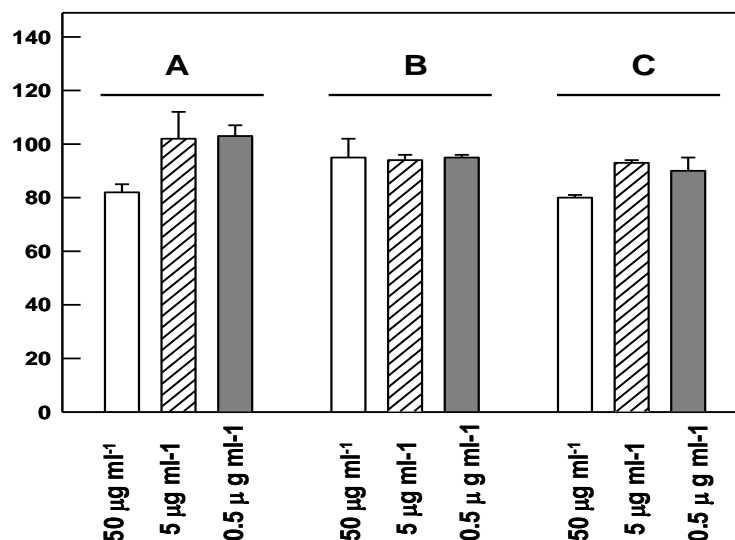


Figura I.3.4. Efeito da (+)-cicloecalenona (A), (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (B) e da cernumidina (C) na actividade da sirtuína 1 (SIRT1) (%) nas concentrações indicadas. Os dados são as médias de determinações realizadas por duplicado. O desvio padrão foi sempre inferior a 15%.

Observou-se que, apesar dos triterpenos (+)-cicloecalenona (**24**) e 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) apresentarem actividade anti-inflamatória, estas respostas não se encontram relacionadas com a activação da sirtuína 1. A prevenção da potencial carcinogénese da cernumidina (**109**) através da regulação da actividade enzimática da sirtuína 1 foi também avaliada. Observou-se que a presença do composto **109** não provocou alterações apreciáveis da actividade da enzima sirtuína 1.

I.3.2.3 Produção da citocina TNF- α

Foi também avaliado o efeito inflamatório dos compostos **24**, **107** e **109** nos níveis de produção da citocina TNF- α cujos resultados se apresentam na Tabela 12. As células foram estimuladas com LPS (lipopolissacáridos) e foi utilizada a dexametasona (C) como controle anti-inflamatório.

A análise da Tabela I.3.2 permite concluir não ocorreu a inibição da produção de TNF- α após a adição de nenhum dos três compostos estudados.

Tabela I.3.2 Efeitos das soluções de (+)-cicloeucalenona (**24**) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da cernumidina (**109**) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) na produção da citocina $\text{TNF-}\alpha$ (pg mL^{-1}).

Compostos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$\text{TNF-}\alpha$ (pg mL^{-1})
C-LPS	$4,20 \pm 0,40$
C+LPS	$166,49 \pm 18,30$
(+)-cicloeucalenona (50)	$334,54 \pm 8,81$
(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (15)	$445,0 \pm 3,88$
cernumidina (50)	$333,05 \pm 24,77$

I.3.2.4 Interleuquina-8

Foi testada a actividade da cernumidina (**109**) na produção de quimoquina proinflamatória interleucina-8 (**IL-8**) em células de carcinoma do cólon HT-29, cuja expressão é primariamente regulada através da actividade transcricional mediada por $\text{NF-}\kappa\text{B}$. A indução de IL-8 activa múltiplas vias de sinalização que conduzem à promoção de respostas angiogénicas, ao aumento de proliferação e sobrevivência das células tumorais e potencia a migração metastática.¹⁷¹ Por isso, a inibição da produção de interleucina-8 ou dos seus efeitos sinalizadores pode constituir uma intervenção terapêutica importante.

A experiência *in vitro* realizada e apresentada na Figura I.3.5 demonstraram que a presença de cernumidina (**109**) inibia a formação de interleuquina-8 de um modo dependente da concentração, atingindo uma redução de 50% para uma concentração de $50 \mu\text{M}$.

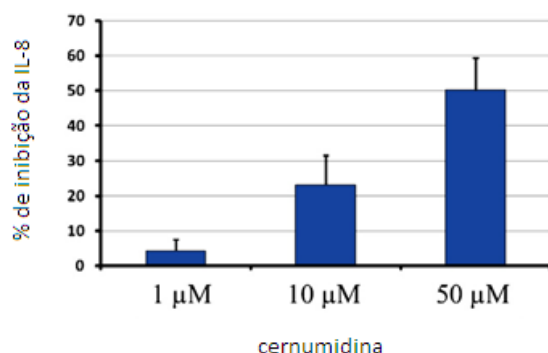


Figura I.3.5 Efeito inibidor da cernumidina (**109**) na produção de interleucina 8 (**IL8**) pelas células HT-29.

I.3.2.5 Actividade anti-neoplásica

Foram realizados ensaios em que se testaram as actividades antiproliferativas da (+)cicloeucaletona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**), da (+)24-(1,3-dioxietano)-31-norcicloartanona (**108**) e da cernumidina (**109**) para diferentes linhas celulares. O uso de várias linhas de células advém do facto de se saber que apresentam uma sensibilidade diferenciada para um dado composto citotóxico. Neste trabalho, foram usadas as linhas celulares humanas de UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, células não pequenas), K-562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-O (renal), NCI-ADR/RES (fenótipo do ovário que expressa multi-resistência) e U251 (glioma).

Os resultados dos ensaios realizados para a (+)-cicloeucaletona (**24**) encontram-se resumidos na Figura I.3.6. A (+)-cicloeucaletona (**24**) não apresentou actividade significativa para nenhuma das linhas celulares testadas.

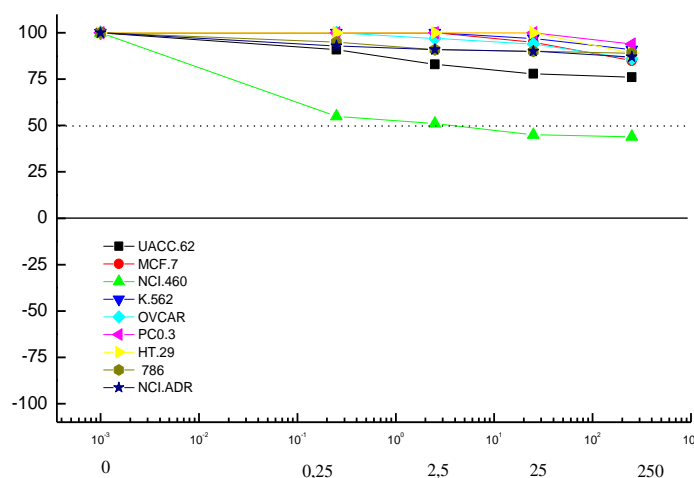


Figura I.3.6- Percentagem de crescimento das linhas de células [UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, non-small cells), K562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-O (renal) e NCI-ADR/RES (fenótipo do ovário que expressa multi-resistência)] na presença de diferentes concentrações de soluções de (+)-cicloeucaletona (**24**).

Os resultados dos ensaios efectuados com a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**), apresentados na Figura I.3.7 e na Tabela I.3.3, mostraram uma inibição significativa do crescimento das células de pulmão da linha NCI-H460, conduzindo à morte celular, em comparação com os valores para a doxirrubicina (DOX), apresentados na Tabela I.3.3, utilizada como referência.

Discussão de Resultados

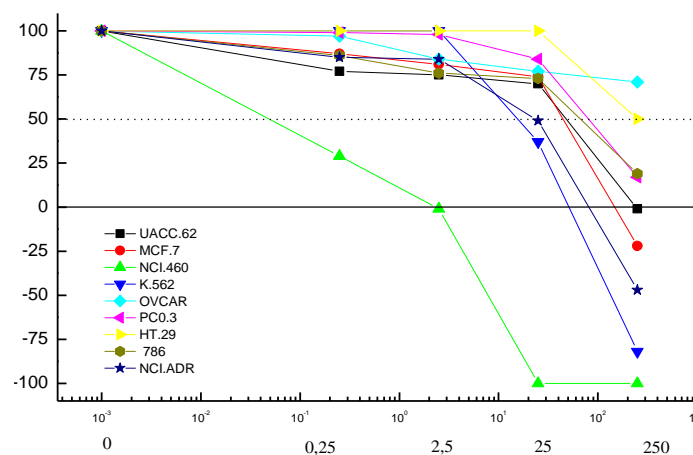


Figura I.3.7 Percentagem de crescimento das linhas de células [UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, *non-small cells*), K562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-O (renal) e NCI-ADR/RES (fenotipo do ovário que expressa multi-resistência)] na presença de diferentes concentrações de soluções de (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**).

A Figura I.3.8 e a Tabela I.3.3 apresentam os resultados dos ensaios efectuados com a 24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (**108**). À semelhança do composto **107** o composto **108** inibiu significativamente o crescimento das células de pulmão da linha NCI-H460.

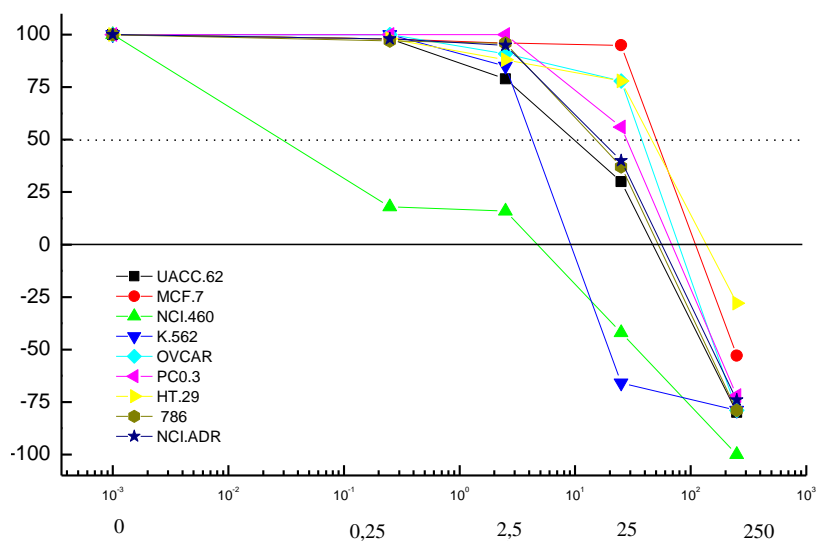


Figura I.3.8 Percentagem de crescimento das linhas de células [UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, *non-small cells*), K562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-O (renal) e NCI-ADR/RES (fenotipo do ovário que expressa multi-resistência)] na presença de diferentes concentrações de soluções de 24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (**108**).

Discussão de Resultados

De acordo com os valores observados na Tabela I.3.3, o composto **107** apresentou um valor de inibição total de crescimento TGI (inibição de crescimento total) de 1,10 µg/mL, de GI 50 (inibição de crescimento 50) de 0,19 µg/mL e LC 50 (concentração letal 50) of 8,43 µg/mL, sendo os dois últimos inferiores aos valores apresentados pela doxorrubicina. Estes resultados sugerem que o triterpeno é eficiente e selectivo para as linhas de células não pequenas do pulmão NCI-H460, a qual expressa elevados níveis de COX-2, sugerindo uma função importante no processo inflamatório e fortalecendo a ligação entre inflamação crónica e o cancro.¹⁷²

Tabela I.3.3 Resultados da acção da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e da (+)-24-(1,3-dioxietano)-31-norcicloartanona (**108**) para as linhas celulares humanas (µg/mL): UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, non-small cells), K562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-O (renal) and NCI-ADR/RES (fenotipo da mama que expressa multi-resistência).

Linhas Celulares	COMPOSTOS								
	107			108			DOX		
	Parâmetros de Inibição de Crescimento								
	TGI	GI 50	LC 50	TGI	GI 50	LC 50	TGI	GI 50	LC 50
UACC-62	>250	28,60	>250	40,7	9,02	235,04	0,91	0,24	8,14
MCF-7	158,3	28,70	>250	142,4	34,86	249,32	5,22	0,23	>250
NCI-H460	1,10	0,19	8,43	1,91	0,06	25,51	1,04	0,25	11,62
K-562	44,30	23,57	198,90	10,2	3,07	23,12	5,23	1,97	>250
OVCAR-3	>250	>250	>250	77,7	29,4	225,90	24,87	1,08	>250
PC-3	>250	89,90	>250	64,46	25,70	229,39	6,05	0,50	88,80
HT-29	>250	>250	>250	150,3	30,47	>250	153,0	1,66	>250
786-O	>250	47,73	>250	46,14	23,73	208,34	8,61	0,25	237,91
NCI-ADR/RES	79,20	24,90	>250	55,85	23,66	22,18	>250	21,66	>250

T= TGI (inibição total do crescimento), G= GI (inibição do crescimento 50%), L= LC (concentração letal 50%), µg/mL >250: a concentração não pôde ser calculada; excedeu o valor da cocentração mais elevada testada.

O composto **108** apresenta valores de inibição ligeiramente superiores aos observados para o composto **107** com a excepção do valor de GI 50 que é inferior também ao observado para o composto de referência. Assim, os valores de inibição total de crescimento TGI de 1,91 µg/mL, de GI 50 de 0,06 µg/mL e LC 50) of 25,51 µg/mL indicam que este triterpeno inibe a proliferação das linhas de células não pequenas do pulmão NCI-H460. O composto **108** exibiu também uma actividade significativa para as células de leucemia (K 562), em comparação com os valores para a DOX.

À semelhança dos triterpenos acima mencionados, a actividade antitumoral da cernumidina (**109**) apresentada na Figura I.3.9, foi também avaliada não tendo sido observada actividade significativa para nenhuma das linhas celulares testadas.

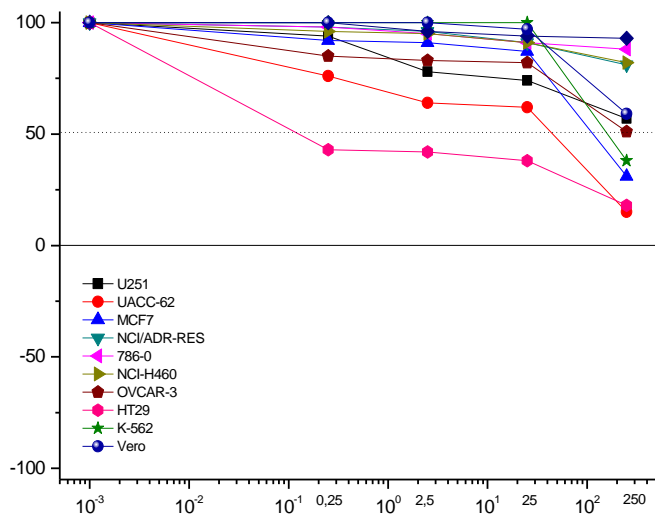


Figura I.3.9 Percentagem de crescimento das linhas de células [U251-glioma, UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (fenotipo do ovário que expressa multi-resistência), 786-O (renal), NCI-H460 (pulmão, *non-small cells*), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (colon), K562 (leucemia), PC-3 (próstata), e VERO (rim, célula normal)] na presença de diferentes concentrações de soluções de cernumidina (**109**).

I.3.2.6 Testes de toxicidade aguda

Foi avaliada a toxicidade aguda de diferentes doses (10, 30, 100 e 600 mg/Kg) de (+)-cicloeucafenona (**24**) e da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) administradas a ratos por via oral e via intraperitoneal. Os animais foram observados após 4 h de administração e mantidos sob observação nos 14 dias seguintes. Os resultados mostraram que os dois compostos não apresentam toxicidade para a gama de doses testadas as quais foram consideradas “seguras”.

I.3.2.7 Actividade antibacteriana

Como foi referido anteriormente, foi avaliada a actividade antibacteriana *in vitro* da (+)-cicloeucalenona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e da cernumidina (**109**) em estirpes de bactérias patogénicas do homem Gram- (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*) e em estirpes de bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*).

Apesar dos extractos **EBD** e **EBE** terem exibido actividade para algumas bactérias Gram+, nenhum dos três compostos isolados testados apresentou actividade para as bactérias testadas o que sugere que a actividade observada no extracto pode ser atribuída a outros compostos presentes no extracto. A presença de flavonóides glicosilados no extracto etanólico quercitrina (**1**), afzelina (**2**) e hiperina (**113**), cuja actividade antimicrobiana é conhecida,¹⁴⁵ pode explicar a actividade antibacteriana observada no extracto. A actividade antibacteriana dos flavonóides pode também contribuir para a actividade anti-ulcerosa apresentada pelo extracto etanólico nos ensaios realizados por Araújo *et al.*¹³

I.3.3 Conclusões

Nestes capítulos são apresentados os resultados do estudo fitoquímico e da avaliação da actividade biológica da planta *Solanum cernuum* Vell. utilizada na medicina tradicional para tratar uma grande variedade de doenças maioritariamente de origem inflamatória, infecciosa e tumoral.

Procedeu-se à extracção da planta com diclorometano e etanol e à avaliação das actividades anti-inflamatória, anti-ulcerosa e antibacteriana dos extractos.

Tanto o extracto de diclorometano (**EBD**) como o extracto etanólico (**EBE**) apresentaram um efeito inibidor significativo, dependente da dose, da actividade anti-inflamatória no modelo de contorção induzida por ácido acético. Por outro lado, no ensaio de edema de orelha foi observada apenas uma actividade moderada do extracto etanólico. Os resultados dos ensaios para avaliar a actividade anti-ulcerosa do extracto diclorometano não revelaram uma actividade significativa contrariamente à actividade anti-ulcerosa potente descrita por Araújo *et al.*¹³ Os testes da actividade antibacteriana apresentaram resultados positivos para algumas estirpes de bactérias Gram+ dos extractos **EBD** e do **EBE**.

Foram isolados a partir do extracto de diclorometano (**EBD**) três triterpenos com esqueleto de 31-norcicloartanona, a (+)-cicloeucalenona (**24**) (7,0% w/w), a (+)-24-oxo-31-norcicloartenona (**107**) (1,47% w/w) e (+)-24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (**108**) (0,05%, w/w), que nunca tinham sido descritos no género *Solanum*. Os três compostos possuem o mesmo núcleo tetracíclico de 31-norcicloartenona com uma unidade de ciclopropano C-9,19 e um grupo metilo em C-4, diferindo na substituição que apresentam na cadeia lateral.

Com o objectivo de saber qual(is) o(s) composto(s) responsável(is) pela actividade anti-inflamatória do extracto de diclorometano foi avaliada a actividade anti-inflamatória dos compostos maioritários (+)-cicloeucalenona (**24**) e da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) utilizando o modelo de contorção induzida por ácido acético. Ambos apresentaram uma redução significativa do número de contorções dependente da dose administrada para as doses de 50 e 100 mg/Kg. Para confirmar este efeito anti-inflamatório foi realizado o ensaio de edema de pata induzido por carragenina. Ambos os compostos inibiram a segunda fase do processo de inflamação neste modelo mas a (+)-24-oxo-31-norcicloartenona (**107**) mostrou ser particularmente activa 4,5 h após a indução da inflamação, altura em que ocorre a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 COX-2 e a secreção de prostaglandinas.

O efeito dos compostos **24** e **107** na expressão da COX-2 foi então examinado. Observou-se que ambos reduziam a expressão da COX-2 mas a inibição provocada pelo composto **107** era mais acentuada o que pode constituir uma estratégia útil para tratar o componente inflamatório.

Foi também estudado o efeito na actividade da enzima sirtuína 1 a qual possui uma função importante no controle da expressão de alguns mediadores da inflamação. Verificou-se que, apesar dos triterpenos (+)-cicloeucalenona (**24**) e (+)-24-oxo-31-norcicloartenona (**107**) apresentarem actividade anti-inflamatória, ela não se encontra relacionada com a activação da sirtuína 1.

O efeito inflamatório dos dois compostos nos níveis de produção da citocina TNF- α foi também avaliado. Não ocorreu a inibição de TNF- α após a adição de nenhum dos dois compostos.

Foram realizados ensaios para avaliar a actividade antiproliferativa dos compostos **24**, **107** e **108**. A (+)-cicloeucalenona (**24**) não apresentou actividade significativa enquanto a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) mostrou ser mais activa e selectiva para a linha celular de pulmão NCI-H460, a qual expressa elevados níveis de COX-2, sugerindo uma função importante no processo inflamatório e fortalecendo a ligação entre inflamação crónica e o cancro.

O terceiro composto, a (+)24-(1,3-dioxetano)-31-norcicloartanona (**108**) apesar de minoritário, também é activa para a linha celular de pulmão NCI-H460 e para as células de leucemia (K 562).

Embora o extracto **EBD** exiba actividade para algumas bactérias Gram-, nem a (+)-cicloeucalenona (**24**) nem a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) inibiram o crescimento de nenhuma das bactérias estudadas. Nenhum dos compostos apresentou toxicidade aguda.

O extracto de etanol (**EBE**) foi também fraccionado e analisado. Foram isolados quatro novos alcalóides: a cernumidina (**109**) (1,92% w/w), a isocernumidina (**110**) (0,25% w/w), a cernumidina B (**111**) (0,53% w/w) e a isocernumidina B (**112**) (0,23% w/w) com uma estrutura em que uma unidade (2-aminopirrolidin-1-il)carboxamidina se encontra acilada com o ácido isoferúlico (3-hidroxi-4-metoxicinâmico) com configurações *E* e *Z*, respectivamente. As estruturas foram elucidadas com base em dados espectroscópicos uni- e bidimensionais e a estrutura da cernumidina (**109**) confirmada por análise de raios X. Ambos os compostos apresentam um grupo funcional amina raro, o qual é susceptível de racemização.

A cernumidina (**119**) apresentou uma inibição da produção da interleuquina-8 (**IL-8**) pelas células do carcinoma do cólon HT-29 superior a 50% a uma concentração de 50 μ M o que pode constituir uma intervenção terapêutica significativa tendo como alvo a vizinhança do tumor.

Em células do macrófago THP-1 a cernumidina não inibiu a produção de TNF- α . Foi também avaliado o potencial da carcinogénese através da avaliação da regulação da actividade enzimática da sirtuína 1 não tendo sido observadas alterações significativas da actividade desta enzima. À semelhança dos outros compostos, a actividade antiproliferativa do compostos **109** foi avaliada para dez linhas celulares tumorais mas não apresentou actividade significativa.

Foi testada a actividade antimicrobiana do composto **109** para bactérias Gram+ e Gram+ mas não foram observados valores apreciáveis.

Foram também isolados três flavonóides glicosilados: a quercitrina (**1**) (0,42% w/w), a afzelina (**2**) (0,13% w/w) e a hiperina (**113**) (0,03% w/w) e o ácido ferúlico (**114**) (0,07% w/w).

Foi também isolada a *N*-acetildopamina (**115**) (0,52% w/w), um derivado da dopamina acetilado, o qual nunca tinha sido encontrado em espécies vegetais. Está ainda a ser avaliada a actividade farmacológica do composto **115**: a actividade anti-inflamatória, a actividade antiproliferativa e a atividade para doenças neurodegenerativas.

Este trabalho resultou num avanço de conhecimento sobre a planta *Solanum cernuum* Vell. e sobre as razões que conduzem à sua utilização na medicina tradicional brasileira para tratar uma grande variedade de doenças maioritariamente de origem inflamatória, infecciosa e tumoral.

Os estudos efectuados revelaram a presença de um conjunto de metabolitos com estruturas diferentes. Alguns deles apresentaram atividades anti-inflamatórias significativas, capazes de atuar em moléculas alvo das redes de sinalização que medeiam a inflamação e o cancro. Por isso podem constituir estratégias de intervenção terapêutica para prevenir a carcinogénese.

Os resultados da avaliação da actividade antitumoral de alguns destes compostos foram também muito animadores o que gera a esperança de poderem vir a ser utilizados como modelos na busca de novos fármacos para o tratamento de alguns tipos de cancro.

Capítulo I.4

Estudo fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell

PARTE EXPERIMENTAL

I.4.1. Equipamento e condições experimentais

Os solventes utilizados foram comerciais salvo indicação específica.

Para cada composto isolado é referido o valor da massa obtida expressa em gramas e o seu valor percentual relativamente ao valor de peso seco e moído da planta (% w/w).

Os valores de rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25}$) foram determinados a partir das leituras realizadas num polarímetro Perkin Elmer 241MC (c em g/100 mL) estando em cada caso indicado o solvente utilizado.

Os espectros no infravermelho (IV) foram registados num espectrofotómetro de transformada de Fourier FT-IR Perkin Elmer modelo 1000, em pastilha de KBr ou filme em célula de NaCl, sendo indicado em cada caso o processo utilizado. Na descrição de cada espectro, os dados são indicados na seguinte ordem: suporte da amostra - KBr (em pastilha de brometo de potássio) ou filme (em célula de NaCl); número de onda máximo de banda de absorção - $\lambda_{\text{máx}}$ (em cm^{-1}); atribuição da vibração a uma ligação entre átomos da molécula.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN) e de carbono (^{13}C RMN), foram registados num espectrómetro Brucker modelo ARX-400 (400 MHz) ou modelo Avance III (600 MHz). Como solventes foram usados CDCl_3 , CD_3OD e $\text{DMSO}-d_6$, usando como referência os sinais residuais dos solventes (clorofórmio: δ 7,26 ppm e 77,0 ppm; metanol: δ 3,30 ppm e 49,0 ppm; dimetilsulfóxido: δ 2,49 ppm e 39,7 ppm). Na descrição de cada espectro os dados são indicados pela ordem seguinte: solvente; desvio químico - δ (em ppm); intensidade relativa - $n\text{H}$ (como número de protões); multiplicidade do sinal - s (singuleto), sl (singuleto largo), d (duplete), dl (duplete largo), dd (duplete duplo), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete); constante de acoplamento - J (em Hz); atribuição a protões da molécula. A presença de protões lábeis foi confirmada após adição de D_2O e observada a permuta com deutério.

Os espectros de massa de GC-EIMS dos terpenos com esqueleto de 31-norcicloartanona foram traçados num espectrómetro de massa Micromass GC-TOF (GCT) com uma coluna DB1 (d.i. = 0.32 mm; espessura de filme = 0.25 μm ; comprimento = 30 m). As condições de GC usadas foram: He como gás de transporte; razão de split 1:10; temperatura de injeção, 250 °C; programa de temperaturas, 120 °C durante 3 min, gradiente de 5 °C/min to 300 °C, durante 10 min.

Os espectros de massa das cernumidinas foram traçados num espectrómetro de massa Bruker Microtof na Universidade de Santiago de Compostela (USC Espanha).

As medidas de difracção de Raios X foram realizadas num difractómetro Bruker SMART APEX CCD usando radiação monocromada de grafite-Mo K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) a partir de um tubo de Raios X. Os detalhes dos dados cristalográficos e os parâmetros de refinamento estão descritos em baixo. Os programas usados foram: na recolha de dados Smart (Bruker 2003); na redução de dados, Saint (Bruker versão 6); absorção correcção, SADABS version 2.10 (Bruker AXS 2001). A solução estrutural e o refinamento foi realizado usando SHELXTL (Bruker 2003). A estrutura foi resolvida por métodos directos e refinada pelos métodos de mínimos quadrados *full-matrix* em F^2 . Os átomos que não são hidrogénio foram refinados anisotropicamente. Esta desordem foi resolvida por procedimentos *constraint and restraint* padrão em software SHELXL97.

I.4.2. Métodos cromatográficos

I.4.2.1 Cromatografia em Camada Fina

A composição dos extractos de diclorometano e etanólico e a evolução das separações por cromatografia de coluna foram seguidas por cromatografia em camada fina (c.c.f.) usando placas de sílica gel 60 F₂₅₄, 20x20 (Merck nº 5554, Darmstadt, Alemanha) de 0,2 mm de espessura. O eluente utilizado é referido em cada caso.

Após eluição, as placas foram observadas sob radiação ultravioleta no comprimento de onda 254 nm e 366 nm, tendo sido reveladas por pulverização com solução adequada a cada composto em estudo. Foram usados como reveladores solução de ácido molibdofosfórico, solução de Dragendorff de Munier, reagente de Sakaguchi, solução de α -naftol, solução de ninidrina e solução metanólica do éster β -etilamina do ácido difenilbórico (1%) seguida da solução etanólica de polietilenoglicol PEG-4000 (5%).^{173,174}

Cromatografia de Coluna

Na cromatografia de coluna *flash* utilizou-se sílica gel 60, 230-400 mesh (Merck nº 9385, Darmstadt, Alemanha) desactivada com água a 10% enquanto que na cromatografia gravítica foi realizada com sílica gel 60, 70-230 mesh (Merck nº 7734) desactivada com água a 10%. Na

cromatografia de coluna de fase reversa foi utilizada sílica Lichroprep® RP-18 (40-63 µm, Merck nº 13900, Darmstadt, Alemanha). O eluente utilizado é referido em cada caso.

Cromatografia em Placa Preparativa

Nas cromatografias em placa preparativa foram usadas placas de sílica gel F₂₅₄ (Merck nº 5744, Darmstadt, Alemanha) de 0,5 mm de espessura. O eluente utilizado é referido em cada caso.

Cromatografia por Permeação em Gel de Sephadex LH-20

Ao gel de Sephadex® LH-20 (GE Healthcare Biosciences AB) foi adicionado metanol e a suspensão ficou a equilibrar durante uma noite. Em seguida a suspensão do gel em metanol foi colocada de uma só vez na coluna. Foi eluído de 2 a 24 horas até fluxo constante e boa compactação do gel. A amostra a separar foi dissolvida num volume mínimo de eluente no cimo da coluna. De seguida foram adicionados sucessivos volumes de eluente. As fracções foram recolhidas num colector de fracções e analisadas por cromatografia em camada fina.

I.4.3. Determinação estrutural

I.4.3.1. Material vegetal

As folhas de *Solanum cernuum* Vell. foram colhidas nos arredores da cidade Bragança Paulista (São Paulo - Brasil) em Setembro de 2004 e identificadas pelo Professor Keigo Minami da Universidade de São Paulo. Um exemplar foi registado (VELL Nº 653) e incorporado no herbário Frei Velloso da Universidade de São Francisco (São Paulo – Brasil).

I.4.3.2. Extracção

Após secagem a 45 °C, as folhas (600 g) foram trituradas e pulverizadas. De seguida foram extraídas sucessivamente com diclorometano (três vezes) e com etanol 95% (três vezes) à temperatura ambiente. Ambos os solventes foram evaporados a pressão reduzida tendo sido obtidos os extractos de diclorometano (**EBD**) (40 g) e de etanol (**EBE**) (55 g).

I.4.3.3. Isolamento dos Metabolitos Estudados

Extracto de Diclorometano (EBD)

Procedeu-se à separação de 40 g do extracto de diclorometano (**EBD**) por cromatografia em coluna em sílica gel 60, desactivada com água a 10 % (*n*-hexano/acetato de etilo 9/1 (V/V)) tendo sido recolhidas nove fracções **A-I** de polaridade crescente.

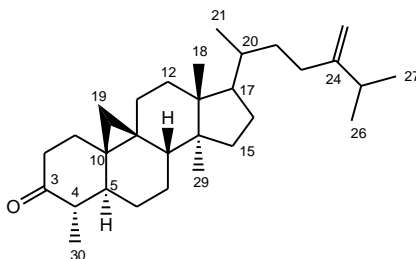
A fracção **B** (16,85 g) foi separada por cromatografia *flash* em sílica gel (*n*-hexano/acetato de etilo 95/5 (V/V)) tendo sido recolhidas dez fracções **B1-B10**. A fracção **B3** (8,5 g) foi novamente separada por cromatografia *flash* em sílica gel (*n*-hexano/acetato de etilo 97/3 (V/V)) tendo sido recolhidas oito fracções **B31-B38**. Desta separação resultou a cicloeucalenona (**24**) (2,80 g, 7,0 %).

A fracção **B33** (454,7 mg) foi separada por cromatografia de coluna gravítica em sílica gel com a mistura (*n*-hexano/ acetato de etilo 97/3 (V/V)) recolhendo-se fracções de polaridade crescente. A mistura foi novamente separada por cromatografia de coluna com a mistura (*n*-hexano/ acetato de etilo 95/5 (V/V)) e por cromatografia em placa preparativa usando como eluente a mistura (*n*-hexano/ acetato de etilo 95/5 (V/V)). Desta separação resultou o isolamento de (+)24-(1,3-dioxietano)-31-norcicloartanona (**108**) (20 mg, 0,05%).

A fracção **B5** foi separada por cromatografia gravítica em sílica gel (*n*-hexano/acetato de etilo 95/5 (V/V)) tendo sido recolhidas seis fracções **B51-B56**. As fracções **B54** (877,8 mg), **B55** (121,1 mg) e **B56** (161,1 mg) foram novamente separadas por cromatografia gravítica em sílica gel (*n*-hexano/acetato de etilo 9/1 (V/V)). Desta separação resultou o isolamento de 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) (589 mg, 1,47 %).

(+)-Cicloeucalenona (**24**) [24-metil-31-norcicloart-24(28)-en-3-ona]

[(2aR,3R,5aS,8S,11aR,12aS)-2a,5a,8-trimetil-3-((R)-6-metil-5-metilene-heptan-2-il)tetradecahidro-ciclopenta[a]ciclopropa[e]fenantren-9(1H)-ona]



Sólido amorfo (2,80 g).

$[\alpha]_D^{20} +54,9^\circ$ (c 0,67, CHCl₃).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm⁻¹: 3020 (CH), 2927 (CH), 1711 (C=O), 1642 (C=CH₂), 1465, 1375, 886 (C=CH₂).

¹H RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 4,72 (1H, *sl*, H-28A); 4,66 (1H, *sl*, H-28B); 2,42 (1H, *m*, H-2 β); 2,23 (1H, *m*, H-4); 2,22 (1H, *h*, $J_{25,26/27}=6,3$ Hz, H-25); 2,08 (1H, *m*, H-23); 1,89 (1H, *m*, H-23); 1,89 (1H, *m*, H-16); 1,66 (1H, *m*, H-1 α); 1,65 (1H, *m*, H-22); 1,57 (1H, *m*, H-6 α); 1,54 (1H, *m*, H-17); 1,40 (1H, *m*, H-20); 1,39 (1H, *m*, H-7 β); 1,17 (1H, *m*, H-22); 1,17 (1H, *m*, H-7 α); 1,02 (3H, *d*, $J_{26,25}=6,8$ Hz, CH₃-26*); 1,03 (3H, *d*, $J_{26,25}=6,8$ Hz, CH₃-27*); 1,00 (3H, *s*, CH₃-18); 0,98 (3H, *d*, $J_{30,4}=6,7$ Hz, CH₃-30); 0,91 (3H, *s*, CH₃-29); 0,90 (3H, *d*, $J_{21,20}=4,8$ Hz, CH₃-21); 0,73 (1H, *qd*, $J_{6\beta,6\alpha}=11,2$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=3,0$ Hz, H-6 β); 0,62 (1H, *d*, $J_{19\text{endo},19\text{exo}}=3,6$ Hz); 0,39 (1H, *d*, $J_{19\text{exo},19\text{endo}}=4,0$ Hz).

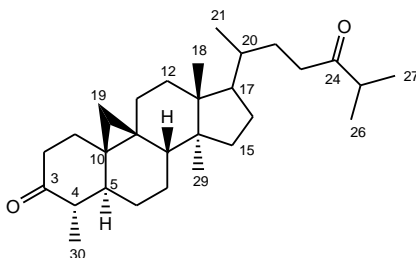
¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 213,3 (C-3); 156,8 (C-24); 106,0 (C-28); 52,2 (C-17); 50,0 (C-4); 48,8 (C-14); 47,1 (C-8); 46,0 (C-5); 45,4 (C-13); 41,0 (C-2); 36,1 (C-20); 35,4 (C-12); 35,0 (C-22); 33,8 (C-25); 32,8 (C-15); 32,8 (C-1); 31,3 (C-23); 29,3 (C-10); 28,1 (C-7); 27,2 (C-19); 27,0 (C-16); 25,9 (C-11); 25,2 (C-6); 24,9 (C-9); 22,0 (C-27*); 21,9 (C-26*); 19,2 (C-29); 18,3 (C-21); 17,9 (C-18); 10,7 (C-30).

(* Sinais interconvertíveis).

GC-EIMS m/z (int.rel.): 424 [M]⁺ (26), 409 [M-CH₃]⁺ (24), 381 [M-C₃H₇]⁺ (35), 340 [M-C₅H₁₀O (rearranjo de McLafferty)]⁺ (10), 300 [M-C₈H₁₂O]⁺ (7), 299 [M-C₉H₁₇(cadeia lateral)]⁺ (53), 257 [M-(C₉H₁₇(cadeia lateral)-C₃H₆ (carbonos C-15, C-16 e C-17 do anel D))]⁺ (11), 243 [M-(C₉H₁₇-C₃H₆-CH₂)]⁺ (9), 95 (100).

(+)-24-oxo-31-norcicloartanona (107)

[(2aR,3R,5aS,8S,11aR,12aS)-2a,5a,8-trimetil-3-((R)-6-metil-5-oxoheptan-2-il)tetradecahidro-ciclopenta[a]ciclopropa[e]fenantren-9(1H)-ona]



Sólido amorfo branco (589 mg).

$[\alpha]_D^{20} +53,3^\circ$ (c 0,46, CHCl₃).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm⁻¹: 3020 (CH), 2930 (CH), 1711 (C=O), 1450, 1376.

¹H RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 2,61 (1H, *h*, $J_{25,26/27}=6,9$ Hz, H-25); 2,49 (1H, *m*, H-23A); 2,41 (1H, *m*, H-2 β); 2,38 (1H, *m*, H-23B); 2,22 (1H, *m*, H-4); 1,70 (1H, *m*, H-22); 1,66 (2H, *m*, H-16); 1,66 (2H, *m*, H-1); 1,62 (2H, *m*, H-15); 1,57 (1H, *m*, H-17); 1,37 (1H, *m*, H-20); 1,26 (1H, *m*, H-7 α); 1,20 (1H, *m*, H-22); 1,09 (6H, *d*, $J_{26,25}=6,9$ Hz, CH₃-26, CH₃-27); 0,99 (3H, *s*, CH₃-18); 0,98 (3H, *d*, $J_{30,4}=6,7$ Hz, CH₃-30); 0,90 (3H, *s*, CH₃-29); 0,87 (3H, *d*, $J_{21,20}=6,4$ Hz, CH₃-21); 0,72 (1H, *qd*, $J_{6\beta,6\alpha}=12,0$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=2,4$ Hz, H-6 β); 0,61 (1H, *d*, $J_{19\text{endo},19\text{exo}}=3,8$ Hz); 0,39 (1H, *d*, $J_{19\text{exo},19\text{endo}}=4,0$ Hz).

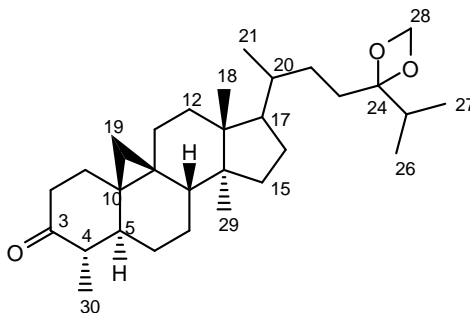
¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 215,4 (C-24); 213,3 (C-3); 52,2 (C-17); 50,0 (C-4); 48,8 (C-14); 47,0 (C-8); 46,0 (C-5); 45,4 (C-13); 40,9 (C-2); 40,8 (C-25); 37,5 (C-23); 35,7 (C-20); 35,4 (C-12); 32,8 (C-15); 32,8 (C-1); 30,1 (C-22); 28,0 (C-7); 27,1 (C-19); 26,9 (C-16); 25,9 (C-11); 25,2 (C-6); 24,9 (C-10); 24,9 (C-9); 19,1 (C-29); 18,4 (C-21); 18,3* (C-26); 18,1* (C-27); 17,9 (C-18); 10,7 (C-30).

(*Sinais interconvertíveis)

GC-EIMS *m/z* (int. rel.): 426 [M]⁺ (38), 411 [M-CH₃]⁺ (22), 340 [M-C₅H₁₀O (rearranjo de McLafferty)]⁺ (83), 299 [M-C₈H₁₅O (cadeia lateral)]⁺ (100), 257 [M-C₈H₁₅O (cadeia lateral) - C₃H₆ (carbonos C-15, C-16 e C-17 do anel D)]⁺ (11), 243 [M-(C₈H₁₅O) - C₃H₆-CH₂]⁺ (8).

(+)-24-(1,3-dioxetan-2-il)-31-norcicloartanona (108)

[(2aR,3R,5aS,8S,11aR,12aS)-3-((R)-4-(2-isopropil-1,3-dioxetan-2-il)butan-2-il)-2a,5a,8-trimetiltetradeca-hidrociclopenta[a]ciclopropa[e]fenantren-9(1H)-ona]



Sólido amorfo branco (20 mg).

$[\alpha]_D^{20} +36,8^\circ$ (c 0,26, CHCl_3).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3020 (CH), 2962, 293, 2874 (CH), 1711 (C=O), 1456, 1375, 1055 (C-O-C).

^1H RMN δ (400 MHz, CDCl_3): 5,10 (1H, *sl*, H-28A); 5,08 (1H, *d*, $J=2,6$ Hz, H-28B); 2,42 (1H, *m*, H-2A); 2,23 (1H, *m*, H-4); 2,05 (1H, *m*, H-25); 1,94 (1H, *m*, H-16A); 1,87 (1H, *m*, H-1A); 1,85 (1H, *m*, H-2B); 1,80 (1H, *m*, H-11A); 1,70 (1H, *m*, H-6 α); 1,66 (1H, *m*, H-23A); 1,65 (1H, *m*, H-8); 1,60 (1H, *m*, H-17); 1,64 (1H, *m*, H-1B); 1,58 (1H, *m*, H-5); 1,59 (1H, *m*, H-12); 1,56 (1H, *m*, H-22A); 1,40 (1H, *m*, H-20); 1,37 (1H, *m*, H-7A); 1,33 (1H, *m*, H-16B); 1,32 (1H, *m*, H-15); 1,27 (1H, *m*, H-23B); 1,25 (1H, *m*, H-11B); 1,12 (1H, *m*, H-22B); 1,12 (1H, *m*, H-7B); 1,00 (3H, *s*, CH_3 -18); 0,99* (3H, *d*, $J_{26,25}=6,7$ Hz, CH_3 -26); 0,98* (3H, *d*, $J_{27,25}=6,7$ Hz, CH_3 -27); 0,97 (3H, *d*, $J_{30,4}=5,7$ Hz, CH_3 -30); 0,90 (3H, *s*, CH_3 -29); 0,88 (3H, *d*, $J_{21,20}=6,6$ Hz, CH_3 -21); 0,73 (1H, *qd*, $J_{6\beta,6\alpha}=12,5$ Hz; $J_{6\beta,7\alpha}=2,3$ Hz, H-6 β); 0,62 (*d*, $J_{19\beta,19\alpha}=3,6$ Hz, H-19 β); 0,40 (1H, *d*, $J_{19\alpha,19\beta}=4,0$ Hz, H-19 α).

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, CDCl_3): 213,4 (C-3); 113,4 (C-24); 94,4 (C-28); 52,1 (C-17); 50,0 (C-4); 48,8 (C-14); 47,1 (C-8); 46,0 (C-5); 45,4 (C-13); 41,0 (C-2); 36,1 (C-20); 35,4 (C-15); 33,2 (C-25); 32,9 (C-12); 32,8 (C-1); 29,6 (C-11); 29,3 (C-10); 29,1 (C-22); 28,1 (C-16); 27,2 (C-23); 27,0 (C-19); 25,8 (C-6); 25,2 (C-7); 24,9 (C-9); 19,2 (C-29); 18,2 (C-21); 17,3 (C-18); 17,5* (C-27); 16,9* (C-26); 10,8 (C-30).

(* Sinais interconvertíveis).

GC-ESI⁺MS m/z (rel. int.): 426 $[\text{M}-\text{OCH}_2]^+$ (10), 411 $[\text{M}-\text{OCH}_2-\text{CH}_3]^+$ (7), 340 $[\text{M}-\text{OCH}_2-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}]^+$ (27), 299 $[\text{M}-\text{OCH}_2-\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}]^+$ (48), 243 $[\text{M}-\text{OCH}_2-(\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{CH}_2)]^+$ (7), 95(100).

Extracto Etanólico (EBE)

Procedeu-se à separação de 4,5 g de extracto etanólico por cromatografia de coluna por permeação em gel de Sephadex LH-20 usando metanol como eluente tendo sido recolhidas seis fracções **A-F**.

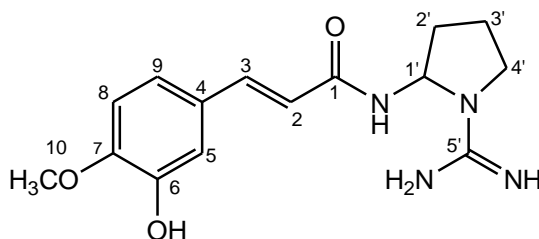
A fracção **D** (253,0 mg) foi purificada por cromatografia de coluna em sílica gel de fase reversa Lichroprep RP-18 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9/1 (V/V)) tendo sido recolhidas seis fracções de polaridade decrescente (**D1-D6**). A fracção **D3** (30,6 mg) foi de novo separada por cromatografia de coluna em

sílica gel de fase reversa Lichroprep RP-18 (H₂O/MeOH 9/1 (V/V)) em gradiente de polaridade decrescente, tendo sido isolada a isocernumidina (**110**) (11,1 mg; 0,25 %). A fracção **D4** era constituída pela cernumidina (**109**) (86,3 mg; 1,92 %). Parte deste sólido foi cristalizado sucessivamente em metanol p.a. até obtenção de cristais para análise por difracção de Raios X. A fracção **D5** foi de novo separada por cromatografia de fase reversa Lichroprep RP-18 (H₂O/MeOH 9/1 (V/V)) em gradiente de polaridade decrescente, tendo sido recolhidas quatro fracções de polaridade decrescente (**D51-D54**). A fracção **D52** era constituída por isocernumidina B (**112**) (10,4 mg; 0,25%) e a fracção **D53** era constituída por cernumidina B (**113**) (23,9 mg; 0,53%).

A fracção **E** (188,5 mg) foi separada por cromatografia de coluna em sílica gel de fase reversa Lichroprep RP-18 (H₂O/MeOH 9/1 (V/V)) tendo sido recolhidas quatro fracções de polaridade decrescente (**E1-E4**). A fracção **E2** (8,1 mg) foi purificada por cromatografia de coluna em sílica gel de fase reversa Lichroprep[®] RP-18 (H₂O/MeOH 9/1 (V/V)) tendo sido obtida a hiperina (**113**) (7,0 mg; 0,14 %). A fracção **E3** era constituída por quercitrina (**1**) (18,9 mg; 0,42%). A fracção **E4** foi separada por cromatografia de coluna em sílica gel de fase reversa Lichroprep RP-18 (H₂O/MeOH 6/4 (V/V)) tendo sido recolhidas quatro fracções de polaridade decrescente (**E41-E44**). A fracção **E41** era constituída por afzelina (canferol-O-ramnosido) (**2**) (6,0 mg; 0,13%). As fracções **E42-E44** foram reunidas e purificadas por cromatografia de coluna em sílica gel de fase reversa Lichroprep RP-18 (H₂O/MeOH 6/4 (V/V)) tendo sido isolados o ácido ferúlico (**114**) (3,3 mg; 0,07%) e a N-acetildopamina (**115**) (23,4 mg; 0,52 %).

Cernumidina (**109**)

[(*E*)-*N*-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida]



Sólido amorfo branco (86,3 mg).

$[\alpha]_D^{20} +10,9^\circ$ (c 0,84, CH₃OH).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3358 (NH), 2941 (CH), 1653 (C=O), 1602, 1510, 1412 (C=C), 1269, 1119, 1021, 977.

^1H RMN δ (400 MHz, CD_3OD): 7,52 (1H, *d*, $J_{3,2}=15,6$ Hz, H-3); 7,05 (1H, *sl*, H-5); 7,01 (1H, *dd*, $J_{9,8}=8,3$ Hz, $J_{9,5}=1,2$ Hz, H-9); 6,92 (1H, *d*, $J_{8,9}=8,3$ Hz, H-8); 6,45 (1H, *d*, $J_{2,3}=15,6$ Hz, H-2); 5,78 (1H, *d*, $J_{1',2'}=5,2$ Hz, H-1'); 3,86 (3H, *sl*, OCH_3); 3,57 (1H, *m*, H-4'A); 3,40 (1H, *m*, H-4'B); 2,30 (2H, *m*, H-2'A e H-3'A); 2,14 (1H, *m*, H-3'B); 2,03 (1H, *m*, H-2'B).

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, CD_3OD): 170,0 (C-1); 156,7 (C-5'); 151,3 (C-7); 148,0 (C-6); 144,4 (C-3); 129,0 (C-4); 122,7 (C-9); 117,6 (C-2); 114,6 (C-5); 112,5 (C-8); 65,4 (C-1'); 56,4 (OCH_3); 48,1 (C-4'); 33,4 (C-2'); 23,7 (C-3').

^1H RMN δ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 9,27 (1H, *sl*, Ar-OH); 9,05 (1H, *d*, $J_{\text{NH},10}=8,2$ Hz, NH); 7,42 (1H, *d*, $J_{8,7}=15,6$ Hz, H-3); 7,00 (1H, *dd*, $J_{6,5}=8,1$ Hz, H-9); 6,99 (1H, *sl*, H-5); 6,95 (1H, *d*, $J_{5,6}=8,0$ Hz, H-8); 6,42 (1H, *d*, $J_{7,8}=15,7$ Hz, H-2); 5,65 (1H, *sl*, H-1'); 3,79 (3H, *sl*, OCH_3); 3,44 (1H, *m*, H-4'A); 3,31 (1H, *m*, H-4'B); 2,18 (2H, *m*, H-2'A e H-3'A); 2,04 (1H, *m*, H-3'B); 1,90 (1H, *sl*, H-2'B).

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 167,2 (C-1); 154,6 (C-5'); 149,8 (C-7); 146,8 (C-6); 141,8 (C-3); 117,2 (C-2); 127,1 (C-4); 113,5 (C-5); 112,1 (C-8); 63,6 (C-1'); 55,6 (OCH_3); 47,0 (C-4'); 32,0 (C-2'); 22,4 (C-3').

ESI-TOF MS modo positivo 305,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

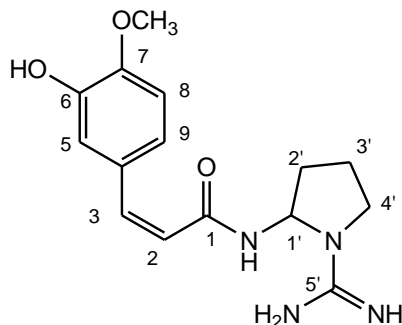
HRESIMS modo positivo m/z 305,1607 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ 305,1569).

Dados de Raios X: A estrutura cristalina foi depositada no Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge (CCDC) e registada com um número de deposição CCDC 820767.

Difracção de Raios X: Dados dos cristais: $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$, placas amarelas cristalinas a partir de metanol $M=361,34$, monoclinicas, $a=17,577(4)$ Å, $b=9,7166(19)$ Å, $c=10,234(2)$ Å, $\beta = 91,77(3)^\circ$, $V=1747,1(6)$ Å³, $T=293(2)$ K, grupo espacial $P21/c$, $Z=4$, $\mu=0,107$ mm⁻¹, 44133 reflexões medidas, 3064 reflexões independentes ($R_{\text{int}} = 0,0333$). Os valores finais $R1$ eram 0,0425 ($I > 2\sigma(I)$) and 0,0539 (todos os dados), and os valores finais $wR(F2)$ eram 0,1518 ($I > 2\sigma(I)$) e 0,1816 (todos os dados). A qualidade de ajustamento da regressão (The goodness of fit) em F^2 era 1,492. Os átomos diferentes de hidrogénio encontravam-se refinados anisotrópicamente. Os átomos de hidrogénio –NH₂ or N3 or N4 encontravam-se desordenados e foram ambos modelados em N3 e N4 (Fig. 1). Código da estrutura depositada CCDC 20767.

Isocernumidina (110)

[(Z)-N-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida]



Óleo amarelo (9,8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ -8,2 ° (c 0,37, CH₃OH).

IV $\bar{u}_{\text{máx}}$ (filme) cm⁻¹: 3331 (OH), 3221 (NH), 2940 (CH), 1650 (C=O), 1600, 1511, 1436 (C=C), 1269, 1225, 1127, 1021.

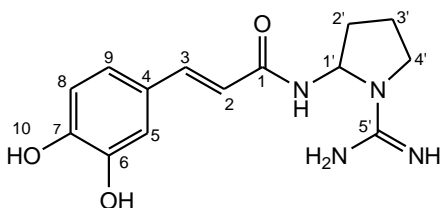
¹H RMN δ (400 MHz, CD₃OD): 7,08 (*d*, $J_{5,9}$ =1,9 Hz, H-5); 6,91 (*dd*, $J_{9,8}$ =8,3 Hz, $J_{9,5}$ =1,8 Hz, H-9); 6,82 (*d*, $J_{8,9}$ =8,4 Hz, H-8); 6,68 (*d*, $J_{3,2}$ =12,6 Hz, H-3); 5,81 (*d*, $J_{2,3}$ =12,6 Hz, H-2); 5,68 (*d*, $J_{1',2'}$ =6,2 Hz, H-1'); 3,80 (3H, *sl*, OCH₃); 3,44 (1H, *m*, H-4'A); 3,33 (1H, *m*, H-4'B); 2,20 (2H, *m*, H-2'A e H-3'A); 2,11 (1H, *m*, H-2'B); 2,05 (1H, *sl*, H-3'B).

¹³C-RMN δ (100,5 MHz, CD₃OD): 171,1 (C-1); 156,7 (C-5'); 150,0 (C-7); 147,1 (C-6); 140,9 (C-3); 129,4 (C-4); 123,7 (C-9); 120,6 (C-2); 117,4 (C-5); 111,9 (C-8); 65,3 (C-1'); 56,4 (OCH₃); 48,2 (C-4'); 33,0 (C-2'); 23,7 (C-3').

ESI-TOF MS modo positivo m/z 305 [M+H]⁺.

Cernumidina B (111)

[(E)-N-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(3,4-di-hidroxifenil)acrilamida]



Óleo incolor (23,9 mg).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3320 (OH), 3218 (NH), 2941 (CH), 1651 (C=O), 1600, 1509, 1434 (C=C), 1265, 1222, 1124, 1021.

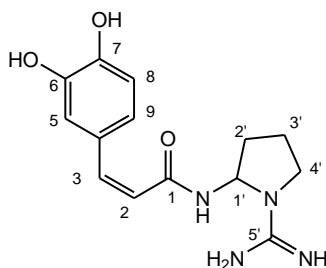
^1H RMN δ (400 MHz, CD_3OD): 7,54 (1H, *d*, $J_{3,2}=15,6$ Hz, H-3); 7,05 (1H, *sl*, H-5); 6,95 (1H, *dl*, $J_{9,8}=8,3$ Hz, H-9); 6,80 (1H, *d*, $J_{8,9}=8,2$ Hz, H-8); 6,43 (1H, *d*, $J_{2,3}=15,6$ Hz, H-2); 5,80 (1H, *d*, $J_{1',2'}=5,4$ Hz, H-1'); 3,60 (1H, *m*, H-4'A); 3,45 (1H, *m*, H-4'B); 2,34 (2H, *m*, H-2'A e H-3'A); 2,18 (1H, *m*, H-3'B); 2,06 (1H, *m*, H-2'B).

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, CD_3OD): 170,2 (C-1); 156,8 (C-5'); 149,4 (C-7); 147,0 (C-6); 145,0 (C-3); 127,8 (C-4); 122,7 (C-9); 116,5 (C-2); 116,5 (C-5); 115,2 (C-8); 65,4 (C-1'); 48,1 (C-4'); 33,4 (C-2'); 23,8 (C-3').

ESI-TOF MS modo positivo m/z 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Isocernumidina B (112)

[(Z)-N-(1-carbamimidolpirrolidin-2-il)-3-(3,4-di-hidroxifenil)acrilamida]



Óleo incolor (10,4 mg).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3334 (OH), 3223 (NH), 2950 (CH), 1655 (C=O), 1604, 1513, 1437 (C=C), 1265, 1222, 1127, 1022.

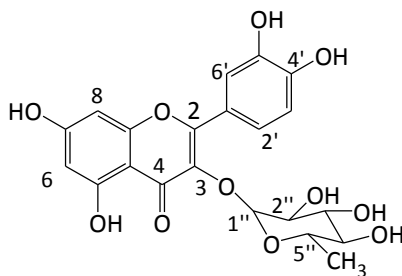
^1H RMN δ (400 MHz, CD_3OD): 7,13 (1H, *d*, $J_{5,9}=1,8$ Hz, H-5); 6,97 (1H, *dd*, $J_{9,8}=8,4$ Hz, $J_{9,5}=1,7$ Hz, H-9); 6,87 (1H, *d*, $J_{8,9}=8,4$ Hz, H-8); 6,75 (1H, *d*, $J_{3,2}=12,3$ Hz, H-3); 5,86 (1H, *d*, $J_{2,3}=12,6$ Hz, H-2); 5,75 (1H, *d*, $J_{1',2'}=6,3$ Hz, H-1'); 3,49 (1H, *m*, H-4'A); 3,38 (1H, *m*, H-4'B); 2,25 (2H, *m*, H-2'A e H-3'A); 2,10 (1H, *m*, H-3'B); 1,92 (1H, *m*, H-2'B).

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, CD_3OD): 170,2 (C-1); 156,8 (C-5'); 148,8 (C-7); 146,8 (C-6); 142,4 (C-3); 128,2 (C-4); 122,7 (C-9); 118,2 (C-2); 116,5 (C-5); 115,2 (C-8); 65,4 (C-1'); 48,4 (C-4'); 33,4 (C-2'); 23,8 (C-3').

ESI-TOF MS modo positivo m/z 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Quercitrina (Quercetina-*O*-ramnosido) (1)

[2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4,5-tri-hidroxi-6-metiltetra-hidro-2H-piran-2-iloxi)-4H-cromen-4-ona]



Sólido amorfo (18,9 mg).

IR $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3400 (OH), 1656 (C=O), 1609 (C=O), 1510, 1450 (C=C), 1364, 1307, 1203, 1088, 958.

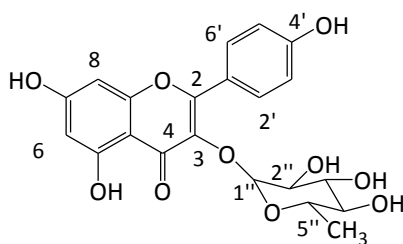
^1H RMN δ (400 MHz, CD_3OD): 7,33 (1H, *d*, $J_{2',6'}=1,8$ Hz, H-2'); 7,30 (1H, *dd*, $J_{6',5'}=8,3$ Hz; $J_{6',2'}=1,8$ Hz, H-6'); 6,90 (1H, *d*, $J_{5',6'}=8,3$ Hz, H-5'); 6,36 (1H, *d*, $J_{8,6}=1,7$ Hz, H-8); 6,19 (1H, *d*, $J_{6,8}=1,7$ Hz, H-6); 5,34 (1H, *d*, $J=0,8$ Hz, H-1''); 4,21 (1H, *dl*, $J=1,3$ Hz, H-2''); 3,74 (1H, *dd*, $J=3,2$ Hz, $J=9,3$ Hz, H-3''); 3,39 (1H, *m*, H-4''); 3,39 (1H, *m*, $J_{5'',6''}=6,0$ Hz, H-5''), 0,93 (3H, *d*, $J_{6'',5''}=6,0$ Hz, CH_3 -6'')

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, CD_3OD): 179,6 (C-4); 165,9 (C-7); 163,2 (C-5); 159,3 (C-9); 158,5 (C-2); 149,8 (C-4'); 146,4 (C-3'); 136,2 (C-3); 123,0 (C-1'); 123,0 (C-6'); 116,9 (C-2'); 116,4 (C-5'); 105,9 (C-10); 103,5 (C-1''); 99,8 (C-6); 94,7 (C-8); 73,2 (C-4''); 72,1* (C-2''); 72,0* (C-3''); 71,9 (C-5''); 17,6 (C-6'').

MALDI-MS-modo positivo m/z 450 $[M+2H]^+$ (9), 303 $[(M+H)\text{-ramnose}]^+$ (19), 187 (100).

Afzelina (Canferol-*O*-ramnosido) (2)

[5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tri-hidroxi-6-metil-tetra-hidro-2H-piran-2-iloxi)-4H-cromen-4-ona]



Sólido amorfo (6,0 mg).

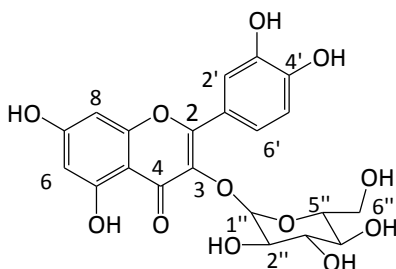
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3379 (OH), 1653 (C=O), 1606(C=O), 1507, 1450 (C=C), 1358, 1174.

^1H RMN δ (600 MHz, CD_3OD): 7,73 (2H, *d*, $J=8,0$ Hz, H-2', H-6'); 6,92 (2H, *d*, $J=8,0$ Hz, H-3', H-5'); 6,13 (1H, *sl*, H-8); 6,02 (1H, *d*, $J_{6,8}=1,4$ Hz, H-6); 5,35 (1H, *sl*, H-1''); 4,24 (1H, *sl*, H-2''); 3,75 (1H, *dd*, $J=2,2$ Hz, $J=6,2$ Hz, H-3''); 3,39 (2H, *m*, H-4'', H-5''); 0,92 (3H, *d*, $J_{6'',5''}=4,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{-6''}$).

^{13}C -RMN δ (125 MHz, CD_3OD): 176,7 (C-4); 169,0 (C-7); 161,1 (C-5); 161,1 (C-4'); 156,7 (C-9); 158,0 (C-2); 133,9 (C-3); 130,3 (C-6'); 130,3 (C-2'); 120,5 (C-1'); 115,7 (C-5'); 115,7 (C-3'); 102,1 (C-1''); 101,7 (C-6); 101,4 (C-10); 95,9 (C-8); 71,9 (C-5''); 71,9 (C-4''); 70,8 (C-3''); 70,5 (C-2''); 16,2 (C-6'').

Hiperina (quercetina-*O*-galactosido) (113)

[2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-((2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-4H-cromen-4-ona]



Sólido amorfo (7,0 mg).

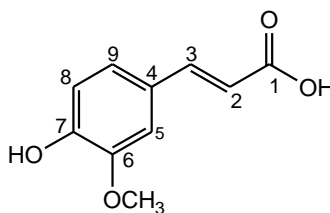
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3350 (OH), 1655 (C=O), 1605 (C=O), 1509, 1450 (C=C), 1360, 1170.

$^1\text{H RMN } \delta$ (600 MHz, CD_3OD): 7,84 (1H, *d*, $J_{2',6'}=1,9$ Hz, H-2'); 7,59 (1H, *dl*, $J_{6',5'}=8,7$ Hz, H-6'); 6,86 (1H, *d*, $J_{5',6'}=8,5$ Hz, H-5'); 6,40 (1H, *d*, $J_{8,6}=1,9$ Hz, H-8); 6,20 (1H, *d*, $J_{6,8}=1,9$ Hz, H-6); 5,17 (1H, *d*, $J=7,8$ Hz, H-1''); 3,80-3,30 (6H, *m*, H-2''- H-6'').

$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (125 MHz, CD_3OD): 179,6 (C-4); 165,9 (C-7); 162,9 (C-5); 159,4 (C-9); 158,2 (C-2); 149,8 (C-4'); 145,8 (C-3'); 135,5 (C-3); 123,0 (C-1'); 122,7 (C-6'); 117,6 (C-5'); 116,0 (C-2'); 105,2 (C-1''); 105,0 (C-10); 99,7 (C-6); 94,7 (C-8); 74,9 (C-3''); 73,0 (C-2''); 69,9 (C-5''); 69,8 (C-4''); 61,5 (C-6'').

Ácido ferúlico (114)¹⁷⁵

[ácido (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilico]



Sólido amorfo (3,3 mg).

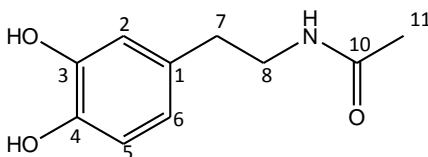
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3406 (OH), 1657 (C=O), 1592, 1510, 1442 (C=C), 1388, 1117.

^1H RMN δ (600 MHz, CD_3OD): 7,40 (1H, *d*, $J_{2,3}=15,7$ Hz), 7,00 (1H, *d*, $J_{5,9}=1,7$ Hz, H-5); 6,91 (1H, *dl*, $J_{9,8}=8,3$ Hz, H-9); 6,76 (1H, *d*, $J_{8,9}=8,1$ Hz, H-8); 6,38 (1H, *d*, $J_{2,3}=15,7$ Hz, H-2); 3,88 (3H, *sl*, OCH_3).

^{13}C -RMN δ (125 MHz, CD_3OD): 172,3 (C-1); 156,7 (C-5'); 150,1 (C-6); 149,3 (C-7); 145,5 (C-3); 128,3 (C-4); 123,7 (C-9); 118,1 (C-2); 116,5 (C-5), 111,7 (C-8); 112,7 (C-6); 56,5 (OCH_3).

***N*-acetildopamina (115)**

[[*N*-(3,4-di-hidroxifenetil)acetamida]]



Óleo castanho (23,4 mg).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3411 (OH), 1641 (C=O).

^1H RMN δ (400 MHz, CD_3OD): 6,67 (1H, *d*, $J_{5,6}=7,9$ Hz, H-5); 6,63 (1H, *d*, $J_{2,6}=0,9$ Hz, H-2), 6,51 (1H, *dl*, $J_{6,5}=6,8$ Hz, H-6); 3,30 (2H, *t*, $J_{8,7}=7,3$ Hz, CH_2 -8); 2,61 (2H, *t*, $J_{8,7}=7,3$ Hz, CH_2 -7); 1,89 (3H, *sl*, CH_3 -11).

^{13}C -RMN δ (100,5 MHz, CD_3OD): 173,2 (C-10); 146,2 (C-3); 144,7 (C-4); 132,0 (C-1); 121,0 (C-6); 116,8 (C-2); 116,4 (C-5); 42,4 (C-8); 35,8; (C-7); 22,5 (C-11).

ESI-TOF MS modo positivo m/z 218,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRESIMS modo positivo m/z 218,0791 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NNaO}_3$ 218,0793), (calc. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ 195,0895).

I.4.4 Anexo 1- Ensaios de actividade biológica

Estudos *in vitro*

I.4.4.1 Actividade antibacteriana

Para a determinação da concentração bactericida mínima (MBC) dos extractos de diclorometano (**EBD**) e de etanol (**EBE**), da (+)cicloeucalenona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e da cernumidina (**109**) foram utilizadas diferentes estirpes de bactérias Gram- (*Escherichia coli* (ATCC 9637), *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Helicobacter pylori* (ATCC 700392) e estirpes de bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)).

A actividade antibacteriana dos extractos **EBD**, **EBE** e dos compostos **24**, **107** e **109** foi testada segundo o método de microdiluição do meio. Foram preparadas soluções do **EBD**, do **EBE**, e dos compostos **24**, **107** e **109** em dimetilsulfóxido de concentrações 200 mgmL⁻¹ e de 2 mgmL⁻¹, respectivamente. A microdiluição do meio foi realizada com o meio Muller-Hinton (Oxoid, UK) usando o soro fetal de vitela (Cultilab, Brasil) como suplemento. Foram preparadas diluições, em duplicado, numa gama de concentrações de 0,6 a 50 mgmL⁻¹ para **EBD** e **EBE** e de 200 a 3,12 mgmL⁻¹ para os compostos isolados.

As estirpes de bactérias foram ajustadas de modo a obter-se uma concentração final de 1,0×10⁶ CFU por poço. Foram aplicados 2µL de cada amostra em cada placa de agar Muller-Hinton (Oxoid, UK) de modo a determinar a MBC. As placas foram observadas entre 24 a 48 horas após a incubação. Todos os ensaios foram realizados em duplicado usando antibióticos (de concentração superior a 1 mg/mL) como controle interno positivo. O valor da concentração bactericida mínima (MBC) representa a menor concentração que mata pelo menos 99,9% do inóculo original. Os resultados são os valores coincidentes de pelo menos três ensaios independentes.

I.4.4.2 Actividade anti-neoplásica

Para a determinação da actividade antiproliferativa da (+)cicloeucaletona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**), da (+)24-(1,3-dioxietano)-31-norcicloartanona (**108**) e da cernumidina (**109**) foram utilizadas linhas celulares de diferentes origens histológicas. As linhas celulares humanas de UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão, células não pequenas), K-562 (leucemia), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-O (renal), NCI-ADR/RES (fenotipo do ovário que expressa multi-resistência) e U251-glioma foram fornecidas pelo National Cancer Institute (NCI, Frederick, Maryland, USA). As culturas de células stock foram desenvolvidas num meio de cultura de 5 mL RPMI-1640 (Gibco, NY, USA) com um suplemento de soro bovino fetal 5% (Gibco). Foi adicionada uma solução de gentamicina (50 µg/mL) a todas as culturas experimentais. Foi utilizado doxirrubicina como fármaco de referência dos ensaios proliferativos.

Foram colocadas culturas de células em microplacas estéreis de 96 poços (100 µL de células/poço variando a gama de densidade de inoculação entre 4 e 7×10^4 células/mL). As culturas de células foram expostas a várias soluções de compostos em RPMI/DMSO com concentrações 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL a 37 °C, 5% de CO₂ no ar durante 48 horas. A concentração final de DMSO (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) não afectou a viabilidade celular. As placas foram então incubadas numa solução 50% de TCA (Merck, SP, Brasil) durante 30 minutos a 4 °C para a fixação celular. Após lavagem e secagem, a proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo celular proteico usando como corante sulforodamina B (SRB) (Sigma). Os dados de absorvância foram usados para calcular a inibição de crescimento total (TGI), a inibição de crescimento 50 (GI 50) e a concentração letal 50 (LC 50) através de uma regressão paramétrica sigmoidal usando o *software* Origin 7.1.

Actividade para moléculas alvo pertencentes à rede de sinalização

I.4.4.3 Produção da citocina TNF-α em células de macrófagos diferenciados THP-1

A produção de citocina TNF-α pro-inflamatória foi quantificada em sobrenadantes de macrófagos diferenciados THP-1 da fase monocítica por adição de PMA (200 nM, 24 horas). Foi realizado um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com as especificações de um *kit*

comercial (e-Biosciences, Biomol, PA, USA). As células foram previamente estimuladas com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foram utilizadas soluções de (+)-cicloeucalenona (**24**) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da cernumidina (**109**) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e utilizada uma solução de dexametasona ($3,4 \mu\text{g/mL}$) como controle anti-inflamatório. Os resultados foram expressos em pg mL^{-1} de $\text{TNF-}\alpha$.

I.4.4.4 Expressão da COX-2 em células diferenciadas THP-1

Para a determinação da expressão proteica da ciclooxygenase-2 (COX-2), em primeiro lugar, a concentração proteica do homogenato foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Bradford. Aliquotas de sobrenadante contendo teores proteicos idênticos a $50 \mu\text{g}$ foram separados em gel de acrilamida a 10% por electroforese em gel de poliacrilamida-SDS (*sodium dodecyl sulfate*). As proteínas foram então transferidas por electroforese para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos primários específicos: COX-2 (M-19, Santa Cruz Biotechnology, CA) a uma diluição de 1:1500. Cada filtro foi lavado 3 vezes durante 15 minutos e incubado com o anticorpo secundário (para COX-2) anti-cabra associado à peroxidase de rábano silvestre. De modo a provar igual carga, a mancha foi analisada para a expressão da β -actina usando um anticorpo anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Mo, USA). A imunodeteção foi realizada usando um kit detector de luz de quimioluminescência acrescida (Supersignal, West pico Chemiluminescent Substrate Pierce, IL., USA). Para a determinação foram realizados três ensaios independentes. Os dados de densitometria foram calculados de acordo com a normalização com o controle (*house-keeping gene*). Os sinais foram analisados e quantificados (*ImageJ, Image Analysis Software*).

I.4.4.5 Actividade da Sirtuína 1 (SIRT1)

O efeito da (+)-cicloeucalenona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**), da cernumidina (**109**) na actividade enzimática da sirtuína 1 (SIRT1) foi determinada com um *kit* comercial (AK-555, SIRT 1 Fluorimetric Drug Discovery Kit, BIOMOL, PA, USA) que mede a actividade da lisil desacetilase do recombinante humano da SIRT1 que utiliza como substracto o péptido humano p53 que compreende os aminoácidos 379-382: Arg-His-Lis-Lis(Ac). O sinal de fluorescência do ensaio gerado é proporcional à desacetilação da lisina Lis-382, o qual é um alvo *in vivo* da actividade da sirtuína 1. O ensaio procede em dois passos: o substracto que compreende a sequência de aminoácidos p53-(Ac) é incubado com o recombinante humano SIRT1 juntamente com o co-substracto NAD^+ . Um produto do *kit* origina um produto fluorófero. Foram utilizados como controle o resveratrol, um activador da

sirtuína, e a suramina de sódio, um inibidor, como controles positivos. A fluorescência das amostras foi lida num fluorímetro leitor de microplacas, na gama de 350 a 380 nm e a detecção da luz emitida foi realizada na gama 450-480 nm em intervalos de 5 minutos. Foram realizados ensaios com soluções (+)-cicloeucalenona (**24**), da (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e de cernumidina (**109**) de concentrações de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados correspondem à média de três ensaios independentes e são expressos como percentagens (%).

I.4.4.6 Efeitos inibidores na produção de interleuquina 8 (IL-8) em células HT-29

As células HT-29 (células do adenocarcinoma do cólon humano) foram fornecidas pela Unidade de Cultura de células da Universidade de Granada (Granada, Espanha) e foram cultivadas no meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) com um suplemento de 10% de FBS e de 2mM de l-glutamina, numa atmosfera de 5% de CO_2 humidificada a 37 °C. As células foram estimuladas com LPS (100 ng mL^{-1}) e simultaneamente tratadas com soluções em DMSO de cernumidina (**109**) de diferentes concentrações (1 μM , 10 μM e 50 μM). Após 24 horas, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados a 10,000 \times g durante 5 minutos e guardados a -80 °C até à determinação de interleucina 8 (IL-8) por ELISA (Biosource, Invitrogen TM). Os resultados são expressos como percentagem de inibição (mean \pm sem) quando comparados com a produção máxima de IL-8 em células sem tratamento.

Estudos *in vivo*

I.4.4.7 Ensaio de edema de orelha

A inflamação foi induzida pela aplicação tópica da solução de óleo de croton (2,5%) a ambas as superfícies da orelha direita de cada rato, de acordo com o método descrito por Romay *et al.*¹⁷⁶ A orelha esquerda (controlo) recebeu o veículo. Os extractos **EBD** e **EBE** de *Solanum cernuum* (1% e 10%) foram administrados oralmente 15 minutos antes do óleo de croton. Foram utilizados dois grupos controle: um grupo que recebeu uma aplicação de óleo de croton na orelha direita e um controle positivo que recebeu também dexametasona (0,4%). A inflamação foi seguida durante 6 h e os animais foram mortos por deslocação cervical. Foi removida uma secção de 6 mm de cada orelha e pesada. O edema de orelha foi dado pela subtração do peso da orelha esquerda (veículo) e o da

orelha direita (com tratamento) e foi expresso como peso do edema. A percentagem de inibição é dada pela redução no peso relativamente ao grupo controle.¹⁷⁷

I.4.4.8 Ensaios de contorção induzida por ácido acético

Foram realizados dois ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético.¹¹⁶ Foram utilizados ratos Balb/C com pesos compreendidos entre 20-35 g os quais foram mantidos numa divisão com temperatura controlada (25 ± 2 °C) com ciclos luz/escurecimento de 12 h e livre acesso a comida e água.

No primeiro ensaio foi avaliado o efeito da administração dos extractos **EBE**, **EBD** a diferentes doses: o extracto **EBD** a 100, 300 e 600 mg/Kg e o extracto **EBE** a 300 e 600 mg/Kg. Foram utilizados dois grupos controle: um grupo (controle negativo) que recebeu uma aplicação de solução de NaCl (0,9%) e um controle positivo que recebeu dipirona (200 mg/Kg). Os animais foram divididos em grupos de dez ratos, consistindo em grupos do **EBD** e do **EBE**, aos quais foram administradas três doses de extracto. A contorção foi induzida por uma injeção i.p. de uma solução de ácido acético 0,8% (10 mL/Kg), 30 minutos após o tratamento. Após a injeção da solução de ácido acético, o número de contorções (constricções abdominais para a avaliação nociceptiva) foi contado cumulativamente durante 15 minutos. Os dados representam a média do total de contorções observadas, o número de *consortium* e a percentagem.

No segundo ensaio, a (+)-cicloeucalenona (**24**), a (+)-24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) e o veículo foram administrados oralmente a diferentes doses: o composto **24** a 50, 100 e 200 mg/Kg e o composto **107** a 10, 50 e 100 mg/Kg. Ao grupo de controle positivo foi administrada metamizole *per os* p.o. (200 mg/Kg) foi administrada. Ao grupo de controle negativo foi administrada solução de NaCl de 0,9%. Os animais foram divididos em grupos de dez ratos, aos quais foram administradas três doses de composto **24** e do composto **107**. A contorção foi induzida por uma injeção i.p. de uma solução de ácido acético 0,8% (10 mL/Kg), 30 minutos após o tratamento. Após a injeção da solução de ácido acético, o número de contorções (constricções abdominais para a avaliação nociceptiva) foi contado cumulativamente durante 15 minutos. Os dados representam a média do total de contorções observadas, o número de *consortium* e a percentagem.

I.4.4.9 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

As experiências foram realizadas de acordo com o método de Posadas *et al.*,¹⁶⁷ e Nunes *et al.*¹⁶⁶ modificado.¹⁷⁸ O volume basal da pata direita traseira dos ratos Balb/C (n= 8 por grupo) foi determinado usando um pletismómetro (Panlab, Spain). Os grupos de ratos foram tratados da seguinte forma: o grupo controle negativo com veículo i.e. com solução salina 0,9%, o grupo controle positivo com solução de piroxicam p.o. (20mg/Kg) e os grupos experimentais com cicloeucalenona (**24**) p.o.(100 mg/Kg) e com 24-oxo-31-norcicloartanona (**107**) p.o. (50 mg/Kg). Após 1 hora de tratamento, a inflamação foi induzida por inoculação de 40 µL de carragenina 2,5% na pata direita traseira e o edema dado pela diferença entre o volume medido e o volume basal foi determinado 1,5 h, 3,0 h, 4,5 h, 6,0 h, 24 h, 48, e 72 horas após a inoculação de carragenina. Os resultados são expressos como variações no tempo do edema da pata (mL).

I.4.4.10 Actividade anti-ulcerosa

A actividade anti-ulcerosa foi avaliada através de dois ensaios modelo para a indução de lesões agudas da mucosa gástrica : i) com solução de etanol (95%)¹⁷⁹ e ii) com indometacina¹⁸⁰. Foram usados ratos macho Wistar com pesos compreendidos entre 190 e 210 g (n=6) em ambos os métodos. Os animais foram mantidos, com água *ad libitum*, em gaiolas adequadas de modo a evitar a co-profagia e em jejum durante 24 horas. Os tratamentos foram efectuados por administração oral - *per os* (*po*). Nos grupos de controle positivo, os animais foram tratados com carbenoxolona (200 mg/Kg/*po*). Após cada experiência, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura e fixados entre duas placas de vidro. As lesões foram medidas pelo método de Gamberini.¹⁸¹

No modelo de lesões induzidas por etanol 95%, os animais receberam etanol 95% (V/V) (1mL/kg/*po*) uma hora depois do tratamento com o **EBD** de *Solanum cernuum* Vell. (500, 1000, 2000 mg/kg). Os animais foram sacrificados uma hora após a administração do agente ulceroso para avaliação da actividade antiulcerosa e determinação da dose efectiva DE 50.

No modelo de lesões induzidas por indometacina, os animais receberam o agente ulceroso (40 mg/kg) uma hora depois da administração do **EBD** de *S. cernuum* Vell. (1000mg/kg). Os animais foram sacrificados 6 horas depois da administração do agente ulceroso para avaliação da actividade antiulcerosa e determinação de DE 50.

I.4.4.11 Toxicidade Aguda

Foram administradas diferentes doses (10, 30, 100, e 600 mg/Kg) dos compostos **24** e **107** a ratos Balb/C e Swiss pelas vias oral e intraperitoneal. Os grupos foram mantidos sob observação durante 4 horas após a administração e depois diariamente durante 14 dias. Foram avaliados os sinais de toxicidade geral tais como a perda de peso corporal, a locomoção, o comportamento (agitação e letargia), a respiração, a salivação, olhos lacrimejantes, a cianose e a mortalidade.

I.4.4.12 Análise Estatística

Todos os valores nas figuras e no texto são expressos como média \pm desvio padrão da média das n observações (*standard error of the mean*). Para os estudo *in vitro* as tabelas são representativas de pelo menos três experiências realizadas em diferentes condições experimentais. No ensaio do ácido acético, os resultados foram analisados pelo método *one-way* ANOVA seguido pelo teste t de Dunnet para comparações múltiplas; as diferenças entre os valores do teste e os valores de controle foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$. No ensaio edema de pata induzido por carragenina, as diferenças entre os valores do teste e os valores de controle foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,0$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ de acordo com o teste de Duncan.

Nos ensaios *in vitro* (actividade da SIRT1 e produção de $\text{TNF-}\alpha$) foram considerados significativos valores de p inferiores a 0,05 e as médias dos grupos individuais foram comparadas com o teste t de Student.

I.5 REFERÊNCIAS

- ¹ Weese, T.L., Bohs, L. (2007) *A three-gene phylogeny of the genus Solanum (Solanaceae)*, Systematic Botany, 32(2), 445-463.
- ² Evans, W., Somanabandhu, A. (1982) *Nitrogen-containing non-steroidal secondary metabolites of Solanum, Cyphomandra, Lycianthes and Maracanthus*, Phytochemistry, 19, 2351-2356.
- ³ Nakamura, T., Komori, C., Lee, Y.Y., Hashimoto, F., Yahara, S., Nohara, T., Ejima, A. (1996) *Cytotoxic activities of Solanum steroidal glycosides*, Biol. Pharm. Bull., 19, 564-566.
- ⁴ Jain, R., Sharma, A., Gupta, S., Sarethy, I.P., Gabrani, R. (2011) *Solanum nigrum: Current perspectives on therapeutical properties*, Alternative Medicine Review, 16, 78-85.
- ⁵ Vlachojannis, J.E., Cameron, M., Chrubasik, S. (2010) *Medicinal use of potato-derived products: a systematic review*, Phytother. Res., 24, 159-162.
- ⁶ Ohno, M., Ono, M., Nohara, T. (2011) *New solanocapsine-type tomato glycoside from ripe fruit of Solanum lycopersicum*, Chem. Pharm. Bull., 59(11), 1403-1405.
- ⁷ Lu, Y., Luo, J., Kong, L. (2011) *Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from Solanum surattense*, Phytochemistry, 72, 668-679.
- ⁸ Ono, M., Nishimura, K., Suzuki, K., Fukushima, T., Igoshi, K., Yoshimitsu, H., Ikeda, T., Nohara, T. (2006) *Steroidal glycosides from the underground parts of Solanum sodomaeum*, Chem. Pharmacol. Bull., 54(2), 230-233.
- ⁹ Usubillaga, A., Aziz, I., Tettamanzi, M.C., Waibel, R., Achenbach, H. (1997) *Steroidal alkaloids from Solanum sycophanta*, Phytochemistry, 44, 537-543.
- ¹⁰ Sun, L.X., Qi, W., Yang, H.Y., Jia, Y.R. (2011) *Nitrogen-containing compounds from Solanum lyratum Thunb*, Biochem. System. Ecol., 39, 203-204;
- ¹¹ Lorenzi, H., Matos, F.J.A. (2002) *Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, São Paulo, p. 459
- ¹² Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A. (2001) *Levantamento etnobotânico de plantas Medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais*, Revista de Ciência e Agrotecnologia, 25, 102-123.
- ¹³ Araújo, C.E.P., Rodrigues, R. F. O., Oliveira, F., Schreiner, L. (2002) *Análise preliminar da atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de Solanum cernuum Vell.*, Acta Farm. Bonaerense, 21(4), 283-286.
- ¹⁴ Alves, T.M.A., Labanca, L., Stehmann, J.R., Zani, C.L. (2006) *Chemical constituents of the water calyx of Solanum cernuum Vell.*, Chem. Nat. Comps., 42, 345-346.

- ¹⁵ Alves, TM.A., Marengo, S., Machado, C., Caldeira, R., Carvalho, O. Isaías, R.M.S., Stehmann, J.R., Zani, C.L. (2007) *Morphological, anatomical, macro and micromolecular markers for Solanum cernuum identification*, Braz. J. Pharmacognosy, 17, 542-548.
- ¹⁶ Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) *The hallmarks of cancer*, Cell, 100, 57-70.
- ¹⁷ Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) *The hallmarks of cancer: the next generation*, Cell, 144, 646-674.
- ¹⁸ Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1996) *Lessons from hereditary colorectal cancer*, Cell, 87, 159-170.
- ¹⁹ Rakoff-Nahoum, S., (2006) *Why cancer and Inflammation?*, Yale Journal of Biology and medicine, 79, 123-130.
- ²⁰ Hussain, S.P., Harris, C.C. (2007) *Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials*, Int. J. Cancer, 121, 2373-2380.
- ²¹ Balkwill, F., Mantovani, A. (2001) *Inflammation and cancer: back to Virchow?*, Lancet, 357, 539-545.
- ²² Schetter, A.J., Heegaard, N.H.H., Harris, C.C. (2010) *Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways*, Carcinogenesis, **31**(1), 37-49.
- ²³ Schottenfeld, D., Beebe-Dimmer, J. (2006) *Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia*, CA Cancer J. Clin., 56, 69-83.
- ²⁴ Matsuzaki, K., Murata, M., Yoshida, K., Sekimoto, G., Uemura, Y., Sakaida, N., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Fujisama, J., Okazaki, K., Seki, T. (2007) *Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma*, Hepatology, 46, 48-57.
- ²⁵ Philpott, M., Ferguson, L.R. (2004) *Immunonutrition and cancer*, Mutat. Res., 551, 29-42.
- ²⁶ Itzkowitz, S.H., Yio, X. (2004) *Inflammation and cancer IV. Colorectal in inflammatory bowel disease: the role of inflammation*, Am. J. Physiol.Gastrointest. Liver Physiol., 287: G7-G17.
- ²⁷ Eaden, J. Abrahms, K., Ekbom, A. Jackson, E., Mayberry, J. (2000) *Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study*, Aliment Pharmacol. Ther., 14, 145-153.
- ²⁸ Munger, K., Howley, P.M. (2002) *Human Papilloma virus immortalization and transformation functions*, Virus Res., 89, 213-228.
- ²⁹ Kundu, J.K., Surh, Y.J. (2005) *Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals*, Mutat. Res., 591, 123-146.
- ³⁰ Kundu, J.K., Surh, Y.J. (2008) *Inflammation: Gearing the journey to cancer*, Mutation Res., 659, 15-30.
- ³¹ Kundu, J.K., Surh, Y.J. (2012) *Emerging avenues linking inflammation and cancer*, Free Radical Biology & Medicine, 52, 2013-2037.

- ³² Xu, H., Chaturvedi, R., Cheng, Y., Bussiere, F.I., Asim, M., Yao, M.D., Potosky, D., Meltzer, S.J., Rhee, J.G., Kim, S.S., Moss, S.F., Hacker, A., Wang, Y., Casero Jr, R.A., Wilson, K.T. (2004) *Spermine oxidation induced by Helicobacter pylori results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis*, Cancer Res., 64, 8521-8525.
- ³³ Jaiswal, M., LaRusso, N.F., Burgart, I.J., Gores, G.J. (2000) *Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism*, Cancer Res., 60, 184-190.
- ³⁴ Pinlaor, S., Sripa, B., Ma, N., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Wongkham, S., Pairojkui, C., Bhudhisawasdi, V., Oikawa, S., Murata, M., Semba, R., Kawanishi, S. (2005) *Nitrate and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion*, World J. Gastroenterol., 11, 4644-4649.
- ³⁵ Bartsch, H., Nair, J. (2005) *Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies*, Mutat. Res., 591, 34-44.
- ³⁶ Ohshima, H., Tazawa, H., Sylla, B.S., Sawa, T. (2005) *Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes*, Mutation Res. 591, 110-122.
- ³⁷ Pikarski, E., Porta, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y. (2004) *NF-kappa functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*, Nature, 23(7007), 2461-466.
- ³⁸ Ghosh, S., Hayden, M.S. (2008) *New regulators of NF-kB in inflammation*, Nat. Rev, 8, 837-848.
- ³⁹ Onizawa, M., Nagaishi, T., Kanai, T., Nagano, K., Oshima, M.S., Nemoto, Y., Yoshioka, A., Totsuka, T., Okamoto, R., Nakamura, T., Sakamoto, N., Tsuuchia, K., Aoki, K., Yagita, H., Watanabe, M. (2009) *Signaling pathway via TNF- α /NF-kB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 296, G850-G859.
- ⁴⁰ Yoshizaki, T., Milne, J., Imamura, T., Schenk, S., Sonoda, N., Babendure, J., Lu, J., Smith, J., Jirousek, M., Olefsky, J. (2009) *SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes*. Molecular and Cellular Biology, 29, 1363-1374.
- ⁴¹ Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., Mayo, M.W. (2004) *Modulation of NF-kB dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase*, EMBO J., 2369-2380.
- ⁴² Yoshizaki, T., Schenk, S., Imamura, T., Babendure, J., Sonoda, N., Bae, E.J., Oh, D.Y., Lu, M., Milne, J.C., Westphal, C., Bandyopadhyay, G., Olefsky, J. (2010) *SIRT1 inhibits inflammatory pathways and modulates insulin sensitivity* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 298, E419-E428.
- ⁴³ Waugh, D.J.J., Wilson, C. (2008) *The interleukin-8 pathway in Cancer*, Clin. Cancer Res. 14, 6735-6741.

- ⁴⁴ Harris, R.E. (2009) *Cyclooxygenase-2 (COX-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*, *Inflammopharmacology*, 17, 55-67.
- ⁴⁵ Kundu, J.K., Surh, Y.J. (2009) *Molecular basis of chemoprevention with dietary phytochemicals: redox-regulated transcription factors as relevant targets*, *Phytochem. Res.*, 8, 333-347.
- ⁴⁶ Kundu, K.K., Surh, Y.J. (2008) *Cancer chemopreventive and therapeutic potential of reverastrol: mechanistic perspectives*, *Cancer Lett.*, 269, 243-261.
- ⁴⁷ Paula, J.A.M., Silva, M.R.R., Costa, M.P., Diniz, D.G.A., Sá, F.A.S., Alves, S.F., Costa, E.A., Lino, R.C., Paula, J.R. (2012) *Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of Pimenta pseudocaryophyllus (Myrtaceae)*, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, doi: 10.1155/2012/420715.
- ⁴⁸ Yingyongnarongkul, B.E., Apiratikul, N., Aroonrerk, N., Suksamrarn, A. (2006) *Solid-phase and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant S. aureus*, *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*, 16, 5870-5873.
- ⁴⁹ Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J.D., Grubb, W.B., Bell, J.M., O'Brien, F.G., Coombs, G.W., Pearman, J.W., Tenover, F.C., Kapi, M., Tiensasitorn, C., Ito, T., Hiramatsu, K. (2002) *Dissemination of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in the community*, *J. clin. Microbiol.*, 40, 4289-4294.
- ⁵⁰ Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005) *Antimicrobial activity of flavonoids*, *Int. J. Antimic. Ag.*, 26, 343-356.
- ⁵¹ Isaev, M.I. (2013) In *Natural Compounds-cycloartane triterpenoids and glycosides. Plant sources, structure and properties*, Ed. Azimova, S.S., Springer, v-viii.
- ⁵² Isaev, M.I., Gorovits, M.B., Abubakirov, N.K., 1985, *Triterpenoids of the cycloartane series*, *Chem. Nat. Comps.*, 21, 399-447.
- ⁵³ Isaev, M.I., Gorovits, M.B., Abubakirov, N.K. (1989) *Progress in the chemistry of the cycloartanes*, *Chem. Nat. Comps.*, 25, 131-147.
- ⁵⁴ Rohmer, M. (1999) *The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants*, *Nat. Prod. Rep.*, 16, 565-574.
- ⁵⁵ Dewick, P.M. (2009) *Medicinal Natural Products*, 3 ed, John Wiley & Sons Ltd.
- ⁵⁶ Kikuchi T., Akihisa, T., Tokuda H., Ukiya, M., Watanabe, K., Nishino, H. (2007) *Cancer chemopreventive effects of cycloartane-type and related triterpenoids in in vitro and in vivo models*, *J. Nat. Prod.*, 70, 918-922.

- ⁵⁷ Ramirez-Cisneros, M.A., Rios, M.Y., Déciga-Campos, M., Aguilar-Guadarrama, A.B. (2012) *Phytochemical study and anti-inflammatory antidiabetic and free radical scavenger evaluations of Krameria pauciflora methanol extract*, *Molecules*, 17, 861-872.
- ⁵⁸ Zhang, H.J., Tan, G.T., Hoang, V.D., Hung, N.V., Cuong, N.M., Soejarto, D.D., Pezzuto, J.M., Fong, H.H.S. (2003) *Natural anti-HIV agents Part IV. Anti-HIV constituents from Vatica cinerea*, *J. Nat. Prod.*, 66, 263-268.
- ⁵⁹ Tuchinda, P., Pompimon, W., Reutrakul, V., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Kongyai, N., Sophasan, S., Sujarit, K., Upatham, S.E., Santisuk, T. (2002) *Tetrahedron*, 58, 8073-8086.
- ⁶⁰ Kongkathip, N., Dhumna-upakorn, P., Kongkathip, B., Chawanoraset, K., Sangchomkaeo, P., Hatthakitpanichakul, S. (2002) *Study on cardiac contractility of cycloeucalenol and cycloeucalenone isolated from Tinospora crispa*, *J. Ethnopharm.*, 83, 95-99.
- ⁶¹ Zamble, A., Sahpaz, S., Hennebelle, T., Carato, P., Bailleul, F. (2006) *N¹,N⁵,N¹⁰-Tris(4-hydroxycinnamoyl)spermidines from Microdesmis keayana roots*, *Chem. & Biodiv.*, 3, 982-989.
- ⁶² Facchini, P.J., Hagel, J., Zulak, K.G. (2002) *Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry*, *Can. J. Bot.*, 80, 577-589.
- ⁶³ Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., Nishioka, T. (2009) *Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 230, 517-527.
- ⁶⁴ Whitaker, B.D., Stommel, J.R. (2003) *Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (Solanum melongena L.) cultivars*, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3448-3454.
- ⁶⁵ Yoshihara, T., Takamatsu, S., Sakamura, S. (1978) *Three new phenolic amides from the roots of eggplant (Solanum melongena L.)* *Agric. Biol. Chem.*, 42(3), 623-627.
- ⁶⁶ Mühlenbeck, U., Kortenbusch, A., Barz, W. (1996) *Formation of hydroxycinnamoylamides and α -hydroxyacetovanillone in cell cultures of Solanum khasianum*, *Phytochemistry*, 42(6), 1573-1579.
- ⁶⁷ Zacarés, L., López-Gresa, M.P., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J.M., Conejero, V. (2007) *Induction of p-coumaroyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen Pseudomonas syringae*, *MPMI*, 20(11), 1439-1448.
- ⁶⁸ King, R.R., Calhoun, L.A. (2005) *Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions*, *Phytochemistry*, 66, 2468-2473.
- ⁶⁹ Baker, C.J., Whitaker, B.D., Mock, N.M., Rice, C.P., Roberts, D.P., Deahl, K.L., Ueng, P.P., Aver'yanov, A.A. (2009) *Phys. Molec. Plant Pathol.*, 73, 109-115.

- ⁷⁰ Muñoz, O., Piovano, M., Garbarino, J., Hellwing, V., Breitmaier, E. (1996) *Tropane alkaloids from Schizanthus litoralis*, *Phytochemistry*, 43(3), 709-713.
- ⁷¹ Navarre, D.A., Payyavula, R.S., Shakya, R., Knowles, N.R., Pillai, S.S. (2013) *Changes in potato phenylpropanoid metabolism during tuber development*, *Plant Physiol. Biochem.*, 65, 89-101.
- ⁷² Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Di Marino, C., Golino, A., Previtera, L., Zarrelli, A. (2003) *Cinnamic amides from Chenopodium album: effects on seeds germination and plant growth*, *Phytochemistry*, 64, 1381-1387.
- ⁷³ Lajide, L., Escoubas, P., Mizutani, J. (1995) *Termite antifeedant activity in Xylopia aethiopica*, *Phytochemistry*, 40, 1105-1112.
- ⁷⁴ Kang, S., Kang, K., Chung, G.C., Choi, D., Ishihara, A., Lee, D.S., Back, K. (2006) *Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin N-hydroxycinnamoyltransferases*, *Plant Physiol.*, 140, 704-715.
- ⁷⁵ Keller, H., Hohlfield, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D., Strack, D. (1996) *Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of Solanum tuberosum*, *Phytochemistry*, 42, 389-396
- ⁷⁶ McLusky, S.R., Bennett, M.H., Beale, M.H., Lewis, M.J., Gaskin, P., Mansfiels, J.W. (1999) *Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by Botrytis allii are associated with actin polarization, peroxidase activity and suppression of flavonoids biosynthesis*, *The Plant journal*, 17, 523-534.
- ⁷⁷ Von Röpenack, E., Parr, A., Schulze-Lefert, P. (1998) *Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley*, *J. Biol. Chem.*, 273, 9013-9022.
- ⁷⁸ Malmberg, A. (1984) *N-Feruloylputrescine in infected potato tubers*, *Acta Chem. Scand.*, B38, 153-155.
- ⁷⁹ Yingyongnarongkul, B.E., Apiratikul, N., Aroonrerk, N., Suksamrarn, A. (2006) *Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicilin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant S. aureus*, *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*, 16, 5870-5873.
- ⁸⁰ López-Gresa, M.P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J.M., Conejero, V. (2011) *Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen Pseudomonas syringae*, *Environm. Exp. Bot.*, 74, 216-228.
- ⁸¹ Park, J.B., Schoene, N. (2002) *Synthesis and characteriazation of N-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292, 1104-1110.

Referências

- ⁸² Spasova, M., Philipov, S., Nikolaeva-Glomb, L., Galabov, A.S., Milkova, Ts. (2008) *Cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of glaucine and their antioxiative and antiviral activities*, Bioorgan. Med. Chem., 16, 7457-7461.
- ⁸³ Kim, E.O., Min, K.J., Kwon, T.K., Um, B.H., Moreau, R.A., Choi, S.W. (2012) *Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages*, Food Chem. Toxicol., 50, 1309-1316.
- ⁸⁴ Milner, S.E., Brunton, N.P., Jones, P.W., O'Brien, N.M., Collins, S.G. (2011) *Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from Solanum species*, J. Agric. Food Chem., 59, 3454-3484.
- ⁸⁵ Schreiber, K. (1968) *Steroidal alkaloids: The Solanum group* In *The Alkaloids; Chemistry and Physiology*, Manske, R.H.F., Ed.; Academic Press: New York, 1968; Vol. 10.
- ⁸⁶ Friedman, M., McDonald, G.M. (1997) *Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology*, Crit. Rev. Plant Sci., 16, 55-132.
- ⁸⁷ Lawson, D.R., Green, T.P., Haynes, L.W., Miller, A.R., (1997) *Nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of solanidine, leptidine, and acetylleptidine. Steroidal alkaloids from Solanum chacoense Bitter*, J. Agric. Food Chem., 45, 4122-4126.
- ⁸⁸ Heftmann, E. (1983) *Biogenesis of steroids in Solanaceae*, Phytochemistry, 22, 1843-1860.
- ⁸⁹ Arif, U. (2013) *Effect of wounding and light exposure on sterol, glycoalkaloid and calystegine levels in potato plants (Solanum tuberosum L. group Tuberosum)*, PhD Thesis, University of Uppsala, Uppsala, Suécia.
- ⁹⁰ Friedman, M. (2002) *Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet*, J. Agric. Food Chem., 50, 5751-5780.
- ⁹¹ Nakamura, T., Komori, C., Lee, Y.Y., Hashimoto, F., Yahara, S., Nohara, T., Ejima, A. (1996) *Cytotoxic activities of Solanum steroidal glycosides*, Biol. Pharm. Bull., 19, 564-566.
- ⁹² Ikeda, T., Ando, J., Miyazono, A., Zhu, X.H., Tsumagari, H., Nohara, T., Yokomizo, K., Uyeda, M. (2000), *Anti-herpes virus activity of Solanum steroidal glycosides*, Biol. Pharm. Bull., 23, 363-364.
- ⁹³ Friedman, M., Rayburn, J.R., Bantle, J.A. (1992) *Structural relationships and developmental toxicity of Solanum alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus*, J. Agric. Food Chem., 40, 1617-1624.
- ⁹⁴ Kupchan, S.M., Davies, A.P., Barboutis, S.J., Schnoes, H.K., Burlingame, A.L. (1969) *Tumor inhibitors. XLIII. Solapalmitine and solapalmitenine, two novel alkaloid tumor inhibitors from Solanum tripartitum*, J. Org. Chem., 34, 3888-3893.
- ⁹⁵ Kupchan, S.M., Bondesson, G., Davies, A.P. (1972) *Tumor inhibitors. 70. Structures-cytotoxicity relationships among N-acyltriamines related to solapalmitine*, J. Med. Chem., 15, 65-68.

- ⁹⁶ Evans, W.C., Somanabandhu, A. (1980) *Nitrogen-containing nos-steroidal secondary metabolites of Solanum, Chyphomandra, Lycianthes and Margaranthus*, *Phytochemistry*, 19, 2351-2356.
- ⁹⁷ Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., Christen, P. (2001) *Calystegenin distribution in some solanaceous species*, *Phytochemistry*, 58, 455-462.
- ⁹⁸ El Sayed, K., Hamann, M.T., Abd El-Rahman, H.A., Zaghlou, A.M. (1998) *New pyrrole alkaloids from Solanum sodomaeum*, *J. Nat. Prod.*, 61, 848-850.
- ⁹⁹ Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D. (2006) *The stereochemistry of Flavonoids* In *The science of Flavonoids*, ed. E. Grotewold, Springer, pp 1-46.
- ¹⁰⁰ Stobiecki, M., Kachlicki, P. (2006) *Isolation and identification of flavonoids* In *The science of Flavonoids*, ed. E. Grotewold, Springer, pp 47-69.
- ¹⁰¹ Lin, J.K., Weng, M.S. (2006) *Flavonoids as nutraceuticals* In *The science of Flavonoids*, ed. E. Grotewold, Springer, pp 213-238.
- ¹⁰² Lewis, C.E., Walker, J.R.L., Lancaster, J.E., Sutton, K.H. (1998) *Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes, I: coloured cultivars of Solanum tuberosum L.*, *J. Sci., Food Agric.*, 77, 45-57.
- ¹⁰³ Wietschel, G., Reznik, H. (1980) *The flavonoid patterns of tuber-bearing Solanum species. II, The flavonoid glycosides of the species from Series I-XVI*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 99, 79-88.
- ¹⁰⁴ Wietschel, G., Reznik, H. (1980) *The flavonoid patterns of tuber-bearing Solanum species. III, The flavonoid glycosides of the species from Series XVIII*, *Z. Pflanzenphysiol.*, 99, 149-158.
- ¹⁰⁵ Wollenweber, E., Dörsam, M., Dörr, M., Roitman, J.N., Valant-Veschera, K.M. (2005) *Chemodiversity of surface flavonoids in Solanaceae*, *Z. Naturforsch.*, 60c, 661-670.
- ¹⁰⁶ Silva, T.M.S., Carvalho, M.G., Braz-Filho, R., Agra, M.F. (2003) *Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero Solanum*, *Quim. Nova*, 26, 517-522.
- ¹⁰⁷ Rauha, J.P. (2001) *The search for biological activity in Finnish plant extracts containin phenolic compounds*, Academic dissertation, Department of Pharmacy, Faculty of Science, University of Helsinki.
- ¹⁰⁸ Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollmann, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993) *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study*, *Lancet*, 342, 1007-1011.
- ¹⁰⁹ Cowen, M.M. (1999) *Plant products as antimicrobial agents*, *Clin. Microb. Rev.*, 12, 564-582.
- ¹¹⁰ Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., , Ortuño, A., Del Rio, J.A. (1997) *Uses and properties of Citrus flavonoids*, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4505-4515.

- ¹¹¹ Tereschuk, M.L., Riera, M.V.Q., Castro, G.R., Abdala, L.R. (1997) *Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Targetes minuta**, J. Ethnopharmacol., 56, 227-232.
- ¹¹² Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000) *Advances in flavonoid research since 1992*, Phytochemistry, 55(6), 481-504.
- ¹¹³ Corson, T.W., Crews, C.M. (2007) *Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials*, Cell, 130, 769-774.
- ¹¹⁴ Shafiee, A., (2003) *The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2pyrazolines in mouse writhing test*, J. Pharmacol. Pharmac. Sci., 6, 359-361.
- ¹¹⁵ Bjorkman, S., Akesson, J., Helfer, M., Fyge, A., Gustafsson, L.L. (1996) *Cerebral uptake of morphine in the pig calculated from arteriovenous plasma-concentration gradients- an alternative to tissue microdialysis*, Life Sciences, 57, 2335-2345.
- ¹¹⁶ Spindola, H.M., servat, L., Denny, C., Rodrigues, R.A.F., Eberlin, M.N., Cabral, E., Sousa, I.M.O., Tamashiro, J.Y., Carvalho, J.E., Foglio, M.A. (2010) *Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Bent.*, BMC Pharmacology, 10, 1-10.
- ¹¹⁷ Giordano, O., Guerreiro, E., Pestchanker, M., Guzmán, J., Pastor, D., Guardia, T. (1990) *The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones*, J. Nat. Prod., 53, 803-809.
- ¹¹⁸ Repetto, M.G., Llesuy, S.F. (2002) *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers*, Braz. J. Med. Biol. Res., 35, 523-534.
- ¹¹⁹ Mizui, T., Doteuchi, M. (1983) *Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats*, Jpn J. Pharmacol., 33, 939-945.
- ¹²⁰ Nakatami, N. (2000) *Phenolic antioxidants from herbs and spices*, Biofactors, 13, Suppl. 1-4, 141-143.
- ¹²¹ Kakimori, M.T. (2010) *Estudo fitoquímico de *Solanum cernuum* Vell.*, Relatório efectuado para o programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, UNISO, Brasil.
- ¹²² Grando, R. (2005) *Fracionamento e identificação de compostos químicos presente no extracto de diclorometano de *Solanum cernuum* Vell.*, Relatório efectuado para o Subprograma X, Projecto X.10 PIGASTRIN do CYTED.
- ¹²³ Cocker, W., McMurry, T.B.H., Ntamila, M.S. (1965) *Extractives from woods. Part VII. extractives from *Cephalosphaera usambariensis**, J. Chem. Soc., 1692-1699.
- ¹²⁴ Akihisa, T., Shimizu, N., Tamura, T., Matsumoto, T. (1986) *(24S)-14 α ,24-dimethyl-9 β ,19-cyclo-5 α -cholest-25-en-3 β -ol: a new sterol and other sterols in *Musa sapientum**, Lipids, 21, 494-497.

Referências

- ¹²⁵ Akihisa, T., Kimura, Y., Kokke, W.C.M., Takase, S.I., Yasukawa, K., Jin-Nai, A., Tamura, T. (1997) 4-Epicycloeucalenone and 4-epicyclomusalenone: two 3-oxo-28-norcycloartanes from the fruit peel of *Musa sapientum* L., Chem. Pharm. Bull, 45(4), 744-746.
- ¹²⁶ Ondeyka, J.G., Jasaruiya, H., Herath, K.B., Guan, Z., Schulman, M., Collado, J., Dombrowski, A.W., Kown, S.S., McCallum, C., Sharma, N., MacNaul, K., Hayes, N., Menke, J., Singh, S.B. (2005) Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors, J. Antibiot., 58(9), 559-565.
- ¹²⁷ Kikuchi, T., Kadota, S., Tsubono, K. (1986) Studies on the constituents of Orchidaceous Plants.IV. Proton and Carbon-13 signal assignments of cycloeucalenol-type triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, Chem. Pharm. Bull., 34(6), 2479-2486
- ¹²⁸ Khuong-Huu, F., Sangare, M., Chari, V.M., Bekaert, A., Devys, M., Barbier, M., Lukacs, G. (1975) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis of cycloartanol and related compounds." *Tetrahedron Lett.* **22+23**: 1787-1790.
- ¹²⁹ Dahmén, J., Leander, K. (1978) A new triterpene glucoside from *Cymbidium giganteum*, Phytochemistry, 17, 1975-1978.
- ¹³⁰ Knapp, F. F., Nicholas, H.J. (1970) The isolation of 31-norcyclolaudenone from *Musa sapientum*, Steroids, 16, 329-351.
- ¹³¹ Kocór, M. Pyrek, J.S. (1973) Cyclotrichosanthol, a new C31 31-Nortriterpene, J. Org. Chem., 38 (21), 3688-3690
- ¹³² Goad, L.J., Akihisa, T. (1997) *Analysis of Sterols*, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, p. 172.
- ¹³³ Goad, L.J., Akihisa, T. (1997) *Analysis of Sterols*, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, p. 167.
- ¹³⁴ Bohme, F., Schmidt, J., Van Sung, T., Adam, G. (1997) 24-methylpollinastone, related triterpenoids and sterols from *Costus*, Phytochemistry, 45(5), 1041-1044.
- ¹³⁵ Goad, L.J., Akihisa, T. (1997) *Analysis of Sterols*, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, p. 147.
- ¹³⁶ Cattel, L., Delprino, L. (1979) Effect of the configuration of the methyl group at C-4 on the capacity of the methyl-9b, 19-cyclosteroids to be substrates of a cyclopropane cleavage enzyme from maize, J. Am. Chem. Oil Soc., 56, 6-11.
- ¹³⁷ Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T. (1998) Cycloartane triterpenes from the fruit peel of *Musa sapientum*, Phytochemistry, 47(6), 1107-1110.

Referências

- ¹³⁸ Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. in *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, Inc, 7ª edição, 2005, USA.
- ¹³⁹ Jin, S., Yoshida, M. (2000) *Antifungal compound, feruloylagmatine, induced in winter wheat exposed to a low temperature*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64(8), 1614-1617.
- ¹⁴⁰ Saleem, M., Kim, H.J., Han, C.K., Jin, C., Lee, Y.S. (2006) *Secondary metabolites from Opuntia ficus-indica var. saboten*, Phytochemistry, 67, 1390-1394.
- ¹⁴¹ Stahl, E., *Thin-layer Chromatography. A Laboratory Handbook* (1969) Springer, Berlim.
- ¹⁴² Bell, E.A., Tirimanna, A.S.L. (1964) *The isolation of γ -hydroxyarginine, as its lactone, from seeds of *Vicia sativa*, and the identification of γ -hydroxyornithine as a naturally occurring amino acid*, Biochem. J., 91, 356-358.
- ¹⁴³ Flack, H.D., Bernardinelli, G. (2008) *The use of X-Ray crystallography to determine absolute configuration*, Chirality, 20, 681-690.
- ¹⁴⁴ Danylec, B., Iskander, M.N. (2002) *^1H RMN Measurement of the trans-cis photoisomerization of cinnamic acid derivatives*, J. Chem. Ed., 79, 1000-1001.
- ¹⁴⁵ Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005) *Antimicrobial activity of flavonoids*, Int. J. Antimic. Agents, 26, 343-356.
- ¹⁴⁶ Markham, K.R., Geiger, H. (1994) *^1H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide*, In *The Flavonoids*, J.B. Harborne (Ed.), pp 441-498, Chapman & Hall, Cambridge
- ¹⁴⁷ Zhong, X. N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., Takeda, Y. (1997) *Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii**, Phytochemistry, 46(5), 943-946.
- ¹⁴⁸ Bilia, A.R., Ciampi, L., Mendez, J., Morelli, I. (1996) *Phytochemical investigations of Licania genus. Flavonoids from Lycania pyrifolia*, Pharmaceutical Acta Helvetiae, 71, 199-204.
- ¹⁴⁹ Waksmondzka-Hajnos, M. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (2008) Taylor and Francis Group, Volume 99, pp 908-909.
- ¹⁵⁰ Liu, K.C.S., Shi-Lin, Y., Roberts, M.F., Phillipson, J.D. (1989) *Flavonol glycosides with acetyl substitution from Kalanchoe gracilis*, Phytochemistry, 28(10), 2813-2818.
- ¹⁵¹ Máximo, P., Lourenço, A., Feio, S.S., Roseiro, J.C. (2002) *A new prenylisoflavone from *Ulex jussiaei**, Z. Naturforsch., 57c, 609-613.
- ¹⁵² Zhong, X. N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., Takeda, Y. (1997) *Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii**, Phytochemistry, 46(5), 943-946.

Referências

- ¹⁵³ Tatsis, E. C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoot, J., Gerathanassis, J.P. (2007) *Identification of the major constituents of Hypericum perforatum by LC/SPE/NMR and/or LC/MS*, *Phytochemistry*, 68, 383-393.
- ¹⁵⁴ Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M. (2003) *Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea*, *Phytochemistry*, 62, 229-237.
- ¹⁵⁵ Markham, K.R., Geiger, H., Jaggy, H. (1992) *Kaempferol-3-O-glucosyl(1-2)rhamnoside form Ginkgo biloba and a reappraisal of other gluco81-2, 1-3 and 1-4)rhamnoside structures*, *Phytochemistry*, 31(3), 1009-1011.
- ¹⁵⁶ Teng, R., Xie, H., Li, H.Z., Wang, D., Yang, C. (2002) *Two new acylated flavonoid glycosides form Morina nepalensis var. alba Hand.-Mazz.*, *Magnet. Reson. Chem.*, 40, 415-420.
- ¹⁵⁷ Yang, M.H., Kong, L.Y. (2008) *Flavonols and flavonol glycosides*, *Chem. Nat. Comp.*, 44, 98-99.
- ¹⁵⁸ Islam, M.S., Yoshimoto, M., Yahara, S. Okuno, S., Ishiguro, K., Yamakawa, O. (2002) *Identification and characterization of foliar poliphenolic composition in sweetpotato (Ipomoea batatas L.) genotypes*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3718-3722.
- ¹⁵⁹ Lee, S.H., Beon, M.S., Kim, M.K. (2001) *Selective growth inhibitor towards human intestinal bacteria derived from Pulsatilla cernua root*, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4656-4661.
- ¹⁶⁰ Yawadio, R., Tanimori, S., Morita, N. (2007) *Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities*, *Food Chem.*, 101, 1616-1625.
- ¹⁶¹ Genathanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M., Boskou, D. (1998) *Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution two dimensional nuclear magnetic resonance. Application to methanolic extracts of two oregano species*, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4185-4192.
- ¹⁶² Xu, R., Huang, X., Morgan, T.D., Prakash, O., Kramer, K.J., Hawley, M.D. (1996) *Characterization of products from the reactions of N-acetyldopamine quinone with N-acetylhistidine*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 329, 56-64.
- ¹⁶³ Nappi, A.J., Vass, E., Carton, Y., Frey, F. (1992) *Identification of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5,6-dihydroxyindole, and N-acetylarenone during eumelanin formation in immune reactive larvae of Drosophila melanogaster*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 20, 181-191.
- ¹⁶⁴ Sugumaran, M., Robinson, W.E. (2010) *Bioactive dehydrotyrosyl and dehydrodopyl compounds of marine origin*, *Mar. Drugs*, 8, 2906-2935.
- ¹⁶⁵ Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962) *Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544-547.
- ¹⁶⁶ Nunes, F., Sampaio, S., Santoro, M., Sousa-E-Silva, M. (2007) *Long-lasting anti-inflammatory properties of Crotalus durissus terrificus snake venom in mice*, *Toxicon.*, 49, 1090-1098.

- ¹⁶⁷ Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G., (2004) *Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression*, British Journal of Pharmacology, 142, 331-338.
- ¹⁶⁸ Pedernera, M.A., Guardia, C., Calderón, C., Rotelli, A.E., de la Rocha, N.E., Saad, V.R., Verrilli, M.A.L., Aseff, S.G.P. (2010) *Anti-inflammatory effect of Acacia visco extracts in animal models*, Inflammopharmacology, 18, 253-260.
- ¹⁶⁹ Yoshizaki, T. Milne, J., Imamura, T., Schenk, S., Sonoda, N., Babendure, J., Lu, J., Smith, J., Jirousek, M., Olefsky, J. (2009) *SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes*. Molecular and Cellular Biology, 29, 1363-1374.
- ¹⁷⁰ Dao, T.T., Le, T.V.T., Nguyen, P.H., Thuong, P.T., Minh, P.T.H., Woo, E.R., Lee, K.Y., Oh, W.K. (2010) *SIRT1 inhibitory diterpenoids from Vietnamese medicinal plant Croton tonkinensis*, Planta Med., 76, 1011-1014.
- ¹⁷¹ Waugh, D., Wilson, C. (2008) *The interleukin-8 pathway in cancer*, Clin. Cancer Res., 14, 6735-6741.
- ¹⁷² Takahashi, T., Kozaki, K., Yatabe, Y., Achiwa, H.T.H. (2002) *Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers*, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 21, 177-181.
- ¹⁷³ Stahl, E., *Thin-layer Chromatography. A Laboratory Handbook* (1969) Springer, Berlin.
- ¹⁷⁴ Waksmondzka-Hajnos, M. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* (2008) Taylor and Francis Group, Volume 99, pp 908-909.
- ¹⁷⁵ Yawadio, R., Tanimori, S., Morita, N. (2007) *Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities*, Food Chem., 101, 1616-1625.
- ¹⁷⁶ Romy, C., Ledón, N., González, R. (1998) *Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation*, Inflamm. Res., 47, 334-338.
- ¹⁷⁷ Garrido, G., González, D., Lemus, Y., Delporte, C., Delgado, R. (2006) *Protective effects of a standard extract of Mangifera indica L. (VIMANG®) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages*, Phytomedicine, 13, 412-418.
- ¹⁷⁸ Vendramini-Costa D, de Castro I, Ruiz A, Marquissolo C, Pilli R, de Carvalho J (2010) *Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice*, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 18, 6742-6747.
- ¹⁷⁹ Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J. (1979) *Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury*, Gastroenterology, 77, 433-443.
- ¹⁸⁰ Morimoto, A., Watanabe, T., Morimoto, K., Nakamori, T., Murakami, N. (1991) *Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats*, J. Physiol., 443, 421-429.

Referências

- ¹⁸¹ Gamberini, M.T., Skorupa, L.A., Souccar, C., Lapa, A.J. (1991) *Inhibition of gastric secretion by a water extract from Baccharis triptera*, Mart. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 86, Suppl. II, 137-139.

Parte II

**Síntese de cromóforos derivados de cumarinas com possíveis aplicações em
dispositivos fotovoltaicos**

Capítulo II.1

**Síntese de cromóforos derivados de cumarinas com possíveis aplicações em
dispositivos fotovoltaicos**

INTRODUÇÃO

II.1 INTRODUÇÃO

Os contributos tecnológicos para sistemas de energia não poluentes são fundamentais para a economia mundial e preservação ambiental. No século XXI, há uma demanda por fontes de energia alternativas e renováveis, incorporando novas tecnologias.

Uma das formas mais interessantes de recurso a fontes de energia renováveis é representada pela conversão da energia solar em electricidade que ocorre nas células solares, envolvendo processos de colheita e de conversão da energia livre do sol e providenciando uma fonte limpa e segura de electricidade.

II.1.1 Células solares sensibilizadas por corante (DSCs)

As células solares sensibilizadas por corantes (Dye-sensitized solar cells DSCs), introduzidas por Grätzel em 1991, constituem um dos mais promissores sistemas de geração de energia usando a tecnologia fotovoltaica. Estes dispositivos utilizam um eléctrodo constituído por um filme mesoporoso de nanopartículas de um óxido metálico semiconductor, de elevada área superficial, e como sensibilizadores compostos orgânicos para a captura de luz solar. É o único sistema solar que separa as duas funções: a colheita da luz (que ocorre no corante) e o transporte por portadores de carga (que ocorre no semiconductor).¹

As DSCs possuem uma estrutura com cinco componentes: i) um suporte mecânico condutor, ii) um filme de óxido metálico semiconductor (em geral TiO_2) com uma estrutura mesoporosa, iii) um sensibilizador (corante), iv) um electrólito ou transportador de lacuna (*hole-transport material* HTM) e v) um contra-electrodo (Figura II.1.1).^{2,3}

Nas DSCs, a luz que entra é absorvida pelo sensibilizador, o qual se encontra adsorvido na superfície do dióxido de titânio nanocristalino semiconductor. Os fotões são absorvidos pela molécula do corante adsorvido (S_{ads}) as quais adquirem energia suficiente para passar do estado fundamental (S_{ads}) para o estado excitado (S^*_{ads}) ou seja os seus electrões passam de uma orbital molecular de menor energia HOMO (highest occupied molecular orbital) para a orbital molecular desocupada de menor energia LUMO (lowest unoccupied molecular orbital). Quando a energia do nível LUMO é ligeiramente superior à energia da banda de condução do semiconductor, os electrões excitados são injectados para a banda de condução do TiO_2 dando origem à separação de carga na interface e são

transportados para o contra-electrodo (transparent conducting oxide TCO) por difusão. Neste processo ocorre a oxidação da molécula do corante (S^+_{ads}).

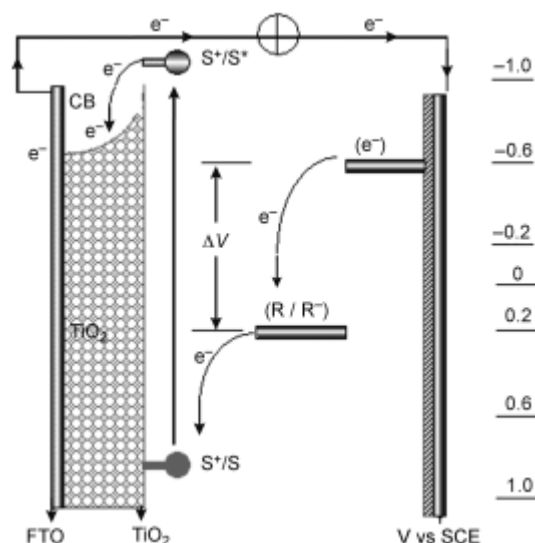


Figura II.1.1 Princípios de operação e níveis de energia de uma DSC. S , S^+ , S^* representam o sensibilizador nos estados fundamental, oxidado e excitado, respectivamente; R/R^+ representa o mediador redox; CB denota a banda de condução.³

São então criadas lacunas (buracos) no estado fundamental, as quais são posteriormente regeneradas (S_{ads}) através da redução efectuada pelo mediador redox (R^+): electrólito ou material transportador de lacuna (I HTM). Este é, por sua vez, regenerado no contra-electrodo por electrões através de um circuito eléctrico externo. Em princípio, para que uma célula seja eficiente, a regeneração do sensibilizador pelo mediador redox (electrólito ou transportador de buraco) deve ser mais rápida do que a recombinação dos electrões da banda de condução com o sensibilizador oxidado. Adicionalmente, a orbital molecular ocupada de maior energia (HOMO) do corante deve situar-se abaixo do nível de energia do mediador redox (electrólito ou transportador de buraco (HTM)), de modo a que os corantes oxidados formados após a injeção de electrões para a banda de condução do TiO₂ possam ser efectivamente regenerados ao aceitar os electrões do mediador redox.

Em circuito externo fechado e com iluminação, uma DSC constitui um sistema de conversão de energia fotovoltaica regenerativo e estável (eq. 1-4).





No entanto ocorrem reacções indesejáveis que reduzem a eficiência tais como a recombinação i.e. a redução do sensibilizador oxidado com os electrões injectados (eq. 5) ou a corrente no escuro i.e. a redução do par redox oxidado com os electrões injectados à superfície do TiO₂ (eq. 6).³



Por isso, os electrões injectados devem ser transportados para o contra-electrodo (TCO) antes destes processos ocorrerem.

As energias relativas na interface semiconductor/corante/electrólito são por isso propriedades importantes a ter em conta no *design* das DSCs (Figura II.1.2). O nível de energia da HOMO é dado pelo valor do potencial de oxidação do corante adsorvido num filme de TiO₂ (E_{ox}) o qual é medido por voltametria cíclica. O nível de energia da LUMO é obtido pela diferença entre o potencial de oxidação E_{ox} e a energia 0-0 do corante à superfície (E_{0-0}) que é estimada a partir dos c.d.o. máximos dos espectros de absorção UV-Vis.⁴

Assim, para que ocorra a injeção do electrão, o potencial de oxidação do corante excitado (correspondente ao nível de energia da LUMO) tem de ser mais negativo do que o potencial da banda de condução do semiconductor e o potencial de oxidação do corante no estado fundamental (correspondente ao nível de energia da HOMO) deve ser mais positivo do que o par redox na solução de electrólito para que constitua a “driving force” para a transferência de lacuna.

Com estes limites estabelecidos, a eficiência da célula é afectada pela posição exacta deste potenciais relativos. Assim, uma variação em qualquer uma destas driving forces tem impacto na fotocorrente de curto circuito (J_{sc}) e no potencial de circuito aberto da célula (V_{oc}). Por isso, a optimização da eficiência (η) de uma DSC que é dada pela expressão:

$$\eta = (J_{sc} V_{oc} FF) / P_{in}$$

em que J_{sc} representa a densidade de fotocorrente medida em curto-circuito, V_{oc} é o potencial de circuito aberto da célula e FF é o factor de enchimento [$FF = P_{m\acute{a}x} / (J_{sc} V_{oc})$ sendo $P_{m\acute{a}x}$ a potência máxima) da célula solar por unidade de área], tem de envolver necessariamente a energética do semiconductor, do corante e do electrólito.⁵

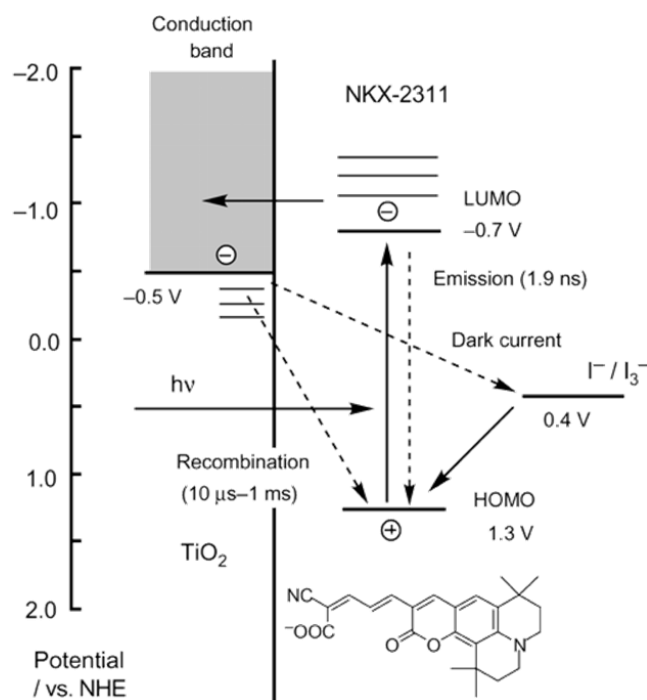


Figura II.1.2 Diagrama de energias esquemático para uma DSC baseada no corante NKX-2311 (1), um electrodo de TiO_2 nanocristalino, e um electrólito I^-/I_3^- . Os potenciais de oxidação (E_{ox}) e $E_{ox}E_{0-0}$ para NKX-2311 são usados como os níveis de energia para a HOMO e a LUMO, respectivamente.⁶

A cinética das reacções representa outro factor decisivo para que os três principais processos envolvidos no funcionamento das DSC ocorram de forma eficiente (Figura II.1.3).⁷ Assim, a injeção de electrões na banda de condução do semiconductor deve ser mais rápida (ordem dos picosegundos) do que o decaimento do corante do estado excitado para o estado fundamental. Para que isto aconteça, a regeneração do corante pelo par redox presente no electrólito tem de ser mais rápida do que a recombinação entre os electrões injetados e o corante oxidado. A velocidade de transporte de electrões no filme semiconductor deve ser superior à velocidade de recombinação entre os electrões injetados na banda de condução e a espécie oxidante do par redox.⁸

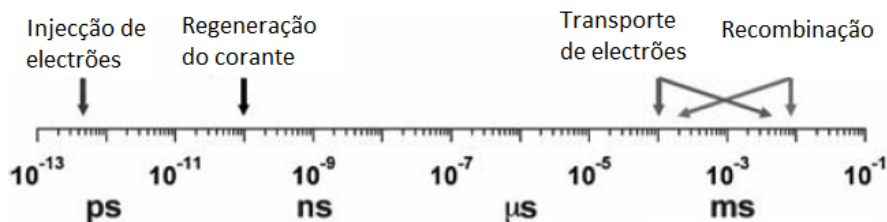


Figura II.1.3 Cinética das reacções numa DSC. Adaptado de (Pagliaro & Palmisano, 2008).⁸

A espectroscopia resolvida no tempo usando pulsos de laser curtos permite a observação directa das reacções consecutivas que se seguem à fotoexcitação das moléculas de corante à superfície dos semicondutores nanocristalinos: i.e. a relaxação intramolecular do corante no estado excitado, a transferência de electrões do corante para o semiconductor, a regeneração do corante oxidado pelos mediadores redox e a transferência de electrões reversa do semiconductor para o corante oxidado (uma reacção desfavorável para uma eficiência elevada).⁹

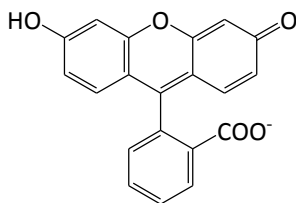
A absorção de radiação de semicondutores de elevado hiato energético ($> 3\text{eV}$) está limitada à gama de comprimento de onda na região do ultravioleta.¹⁰ A presença do corante adsorvido na superfície dos semicondutores nas DSC assegura a absorção de radiação eletromagnética na gama do visível do espectro solar (400-700nm), o que faz com que um electrão adquira energia suficiente para passar do estado fundamental do corante (HOMO) para o estado excitado (LUMO) e possa ser injetado na banda de condução do semiconductor.¹¹

O sensibilizador é, por isso, um dos componentes mais importantes da eficiência e durabilidade de uma DSC.

Para um sensibilizador ser eficiente ele deve obedecer aos requisitos essenciais: i) deve ter uma banda de absorção ampla (pancromática) e um coeficiente de absorção elevado que permitam uma colheita eficiente da luz originando dessa forma uma fotocorrente elevada; ii) deve possuir potenciais redox adequados do nível LUMO para a injecção de electrões para a banda de condução do dióxido de titânio (TiO_2) e do nível HOMO para a aceitação do electrão do mediador redox; iii) deve possuir um grupo de ancoragem ($-\text{COOH}$, $-\text{H}_2\text{PO}_4$, $-\text{SO}_3\text{H}$) que liga fortemente à superfície do semiconductor de modo a promover a injecção unidireccional do electrão do corante excitado para a banda de condução do (TiO_2); iv) o tempo de vida do estado excitado do sensibilizador deve ser um período de tempo suficientemente longo e os electrões excitados devem ser eficientemente injectados para a banda de condução do semiconductor de modo a evitar o decaimento do corante excitado para o estado

fundamental; v) para haver uma injeção do electrão eficiente para o ânodo, a orbital molecular de menor energia desocupada (LUMO) deve estar localizada perto do grupo de ancoragem e acima do bordo da banda de condução do electrodo do semiconductor (em geral TiO_2); vi) de modo a minimizar a recombinação de carga entre os electrões injectados e o corante oxidado, a carga positiva que resulta da injeção do electrão deve estar localizada no grupo dador, o qual está localizado longe da superfície do TiO_2 ; vii) deve existir estabilidade química das reacções redox de modo a conseguir durabilidade a longo-termo da DSC; viii) o corante não deve formar agregados na superfície (o que acontece com filmes mais grossos) de modo a evitar decaimento não radiativo do estado excitado para o estado fundamental, o que pode ser evitado usando ácido desóxicólico (DCA) como adsorvente e 4-*tert*-butilpiridina (TBP) como aditivos.^{2,12, 13}

Os primeiros estudos que envolveram a sensibilização de um corante foram realizados por Gerischer e Tributsch ao sensibilizarem um corante orgânico associado ao óxido de zinco (semiconductor) com uma eficiência de conversão muito baixa.¹⁴



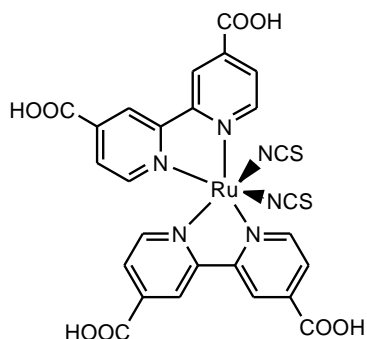
Desde então tem sido realizado um grande esforço para aumentar a eficiência de conversão em DSCs.¹⁵

II.1.2 Complexos de ruténio

Um avanço marcante no desenvolvimento das DSCs foi conseguido, quando, em 1991, O'Regan e Grätzel relataram uma eficiência de conversão (η) de 7,9 % usando como sensibilizadores os complexos polipiridilo de ruténio (II). A estrutura destes complexos organometálicos consiste de um ião central metálico, o ruténio, associado por ligações de coordenação com os ligandos (em geral bi- ou *ter*-piridinas), os quais possuem diferentes substituintes (grupos alquilo, arilo, heterociclos entre outros) e, pelo menos, um grupo de ancoragem que estabelece a ligação com a superfície do semiconductor e facilita a injeção do electrão excitado para a banda de condução do semiconductor.^{16,17}

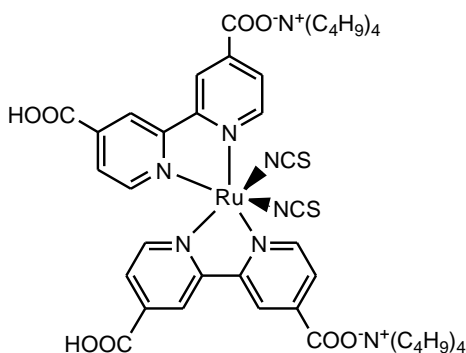
Introdução

Em 1993, uma eficiência de 10% foi atingida usando o corante N_3 (**2**) i.e. o composto cis-di(tiocianato)bis(2,2'-bipiridil-4,4'-dicarboxilato) rutênio (II) como sensibilizador e o par I_3^-/I^- em acetonitrilo como mediador redox.¹⁸ Pela primeira vez uma DSC tinha atingido os valores da eficiência das células solares de silício.⁴



Corante N_3 (**2**)

A forma duplamente protonada de N_3 , o corante $N719$ (**3**), exibiu uma eficiência de conversão ainda mais pronunciada de 11,2%.¹⁹

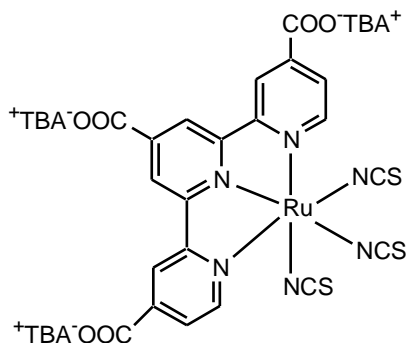


Corante $N719$ (**3**)

Os compostos N_3 e $N719$, considerados como corantes de referência para as DSCs, apresentam espectros de absorção amplos estendendo-se quase até à zona do quase infravermelho por introdução dos grupos tiocianato que são fortes electrodoadores. A fotoexcitação dos corantes baseados em complexos de rutênio resulta numa transição de transferência de carga intramolecular metal-ligando. Os electrões fotoexcitados localizados nos ligandos bipyridilo podem ser eficientemente

injectados para a banda de condução do óxido de titânio via grupos carboxílicos ancorados à superfície do semiconductor. O *design* molecular do corante N3 conseguiu com sucesso, um compostos com propriedades de absorção e de separação de carga eficiente tendo resultado numa eficiência elevada.²⁰

Desde então e com a finalidade de otimizar os fotossensibilizadores foram sintetizados inúmeros complexos de ruténio a partir de diferentes ligandos. Em 2001, Gratzel e colaboradores sintetizaram um sensibilizador pancromático N749, $\{(C_4H_9N)\}_3[Ru(Htcterpi)(NCS)_3]$ (tcterpi=4,4'.4''-tricarboxi-2,2':6',2''-terpiridina), o chamado corante negro (**4**), no qual a resposta espectral tinha sido melhorada por introdução de três ligandos tiocianato e um ligando de *ter*-piridina com três grupos carboxílicos de ancoragem (TBA-*ter*-butilamina).²¹



Corante negro (**4**)

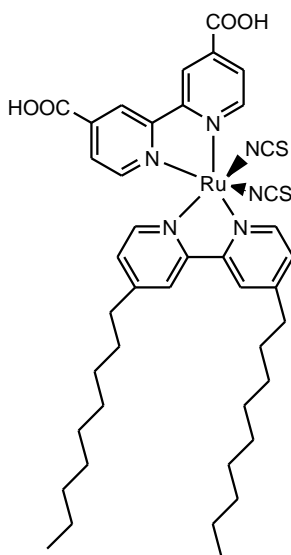
A eficiência fotovoltaica do corante negro (estimada em 10,4%) excedeu a do corante N₃ devido à sua superior capacidade pancromática de colheita de luz juntamente com um rendimento elevado de injeção de electrões do corante excitado para a banda de condução do filme cristalino de TiO₂. Embora este corante apresente um coeficiente de extinção molar inferior ao de N719, a resposta espectral na zona do vermelho e do quase infravermelho é superior, do que resultam correntes de curto circuito superiores.¹³

Apesar de terem sido atingidas eficiências de energia solar-electricidade elevadas em células solares com um sensibilizador pancromático, conseguir a estabilidade das células a longo termo em gamas de temperaturas de 80-85 °C permanecia o principal desafio durante muito tempo devido à presença de solventes orgânicos voláteis no electrolito redox.²² Para aumentar a durabilidade, o electrolito líquido deveria ser substituído ou por um gel ou por um HTM (sólido).

Grätzel e os seus colaboradores sintetizaram um complexo de ruténio Z-907 (**5**), com longas cadeias alquílicas hidrofóbicas, tendo como objectivo um aumento da compatibilidade para electrólitos de gel e da tolerância ao ataque da água. Observou-se que o dispositivo que usou como sensibilizador Z-907 e um electrólito de gel polimérico em combinação com um líquido iónico tinha uma eficiência de 5,3 %²³ e uma boa tolerância à luz e ao stress térmico.²²

A introdução de cadeias alquílicas hidrofóbicas veio assim dar origem a um grupo de fotossensibilizadores de polipiridilo de ruténio anfifílicos, que se caracterizam por uma elevada estabilidade das eficiências das células solares que advêm da insolubilidade na água.²⁴

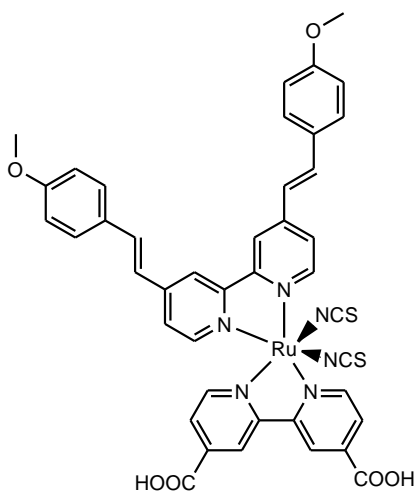
Observou-se também que os sensibilizadores constituídos por complexos de ruténio com cadeias alquílicas hidrofóbicas funcionavam como “blocking layers” na interface spiro-OMeTAD/TiO₂ de células solares de estado sólido, evitando a recombinação de electrões.³



Corante Z-907 (**5**)

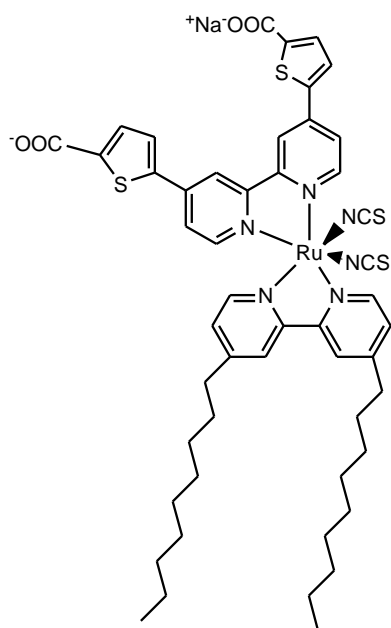
No entanto, estes sensibilizadores anfifílicos apresentavam coeficientes de extinção molares inferiores aos do corante N-719 (**3**)²⁴ o que obrigava ao uso de uma maior da quantidade de sensibilizador (“dye loading”) para aumentar a absorção da luz. Isso favoreceria a formação de agregados na superfície do semi-condutor. Uma maneira de incrementar o coeficiente de extinção molar consistiu em aumentar a extensão de conjugação π do ligando bipyridina, desviando também a transição relativa à transferência de carga metal-ligando (MLCT) para a zona do vermelho. Grätzel e os

colaboradores introduziram um grupo 3-metoxistiril e obtiveram um novo sensibilizador Z-910 (**6**) com uma eficiência de 10,2 % e uma boa estabilidade. O estudo demonstrou que o aumento do coeficiente de extinção molar é uma boa estratégia para o aumento da eficiência dos sensibilizadores de rutênio.²⁵



Corante Z-910 (**6**)

Posteriormente, Mishra et *al.*²⁵ substituíram o ligando 4,4'-dicarboxi piridina de Z-907 com 5,5'-(2,2'-bipirina-4,4'-diil)-bis(tiofeno-2-carboxilato) como ligando de ancoragem dando origem ao complexo de rutênio BTC-2. O complexo BTC-2 (**7**) apresentou um desvio da absorção para a zona do vermelho e um coeficiente de extinção molar acrescido.



Corante BTC-2 (7)

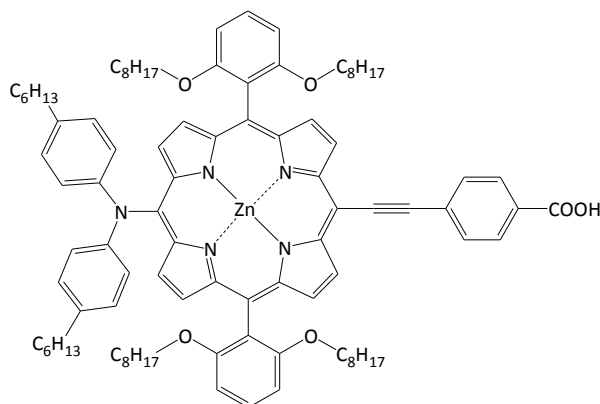
A eficiência de BTC-2 era de 9,1% e a célula resultante apresentava uma estabilidade excelente quando sujeitas a *sun soaking* de 60 °C durante 1000h.²⁶

Desde então foram sintetizados inúmeros sensibilizadores que apresentavam uma boa eficiência e estabilidade a longo termo. Todos estes sensibilizadores possuíam na sua estrutura longas cadeias hidrofóbicas alquílicas ou anéis aromáticos substituídos com grupos alcóxido no grupo etinileno do ligando bipyridínico tendo como objectivo aumentar a absorptividade óptica dos filmes de TiO₂ sensibilizados, aumentar a tolerância ao ataque da água e aumentar a durabilidade do dispositivo.¹³

Apesar de estes complexos de ruténio apresentarem uma eficiência elevada e uma grande estabilidade, não apresentam absorção na zona do vermelho do espectro do visível, possuem coeficientes de extinção molares baixos acima dos 600 nm e envolvem processos de síntese e de purificação complexos. Por outro lado, a limitada disponibilidade do ruténio e o custo resultante da síntese dos corantes à base de ruténio de elevada complexidade estrutural dificultam a introdução deste tipo de células solares no mercado.²

Muito recentemente foi atingido um novo valor de eficiência recorde de 12,3% usando como sensibilizador um complexo porfirina de zinco o YD2-o-C8 (8) cossensibilizado com o corante Y123 e

usando como mediador redox um complexo de cobalto ($\text{CO}^{\text{III/II}}$ (2,2'-bipiridina)).²⁷ Os espectros de absorção destes corantes são complementares e a cossensibilização permite a absorção em todo espectro do visível.²⁸



YD2-o-C8 (**8**)

Como alternativa, foram desenvolvidas DSCs usando como fotossensibilizadores corantes orgânicos. Os corantes orgânicos possuem as vantagens de ter coeficientes de extinção molares maiores (atribuíveis a transições π - π^* intramoleculares), o que faz com que a “colheita” de luz seja mais eficiente e permite o uso de filmes de TiO_2 mais finos. Como desvantagens os espectros de UV-Vis destes compostos apresentam bandas de absorção estreitas na região do visível o que poderia conduzir a uma colheita de luz insatisfatória caso não houvesse a possibilidade de introduzir substituintes na grande variedade de estruturas existentes e de modular dessa forma, os seus espectros de absorção.¹³ Por outro lado, os tempos de vida de emissão dos estados excitados dos sensibilizadores orgânicos são inferiores aos dos complexos metálicos. No entanto, se a injeção de electrões do corante orgânico para a banda de condução do semiconductor for mais rápida do que os tempos de vida de emissão do corante, pode ser conseguida uma separação de carga eficiente.⁶ Por fim, como as moléculas não possuem metais nobres (como o ruténio), o custo global de produção é mais reduzido e o problema dos recursos serem limitados deixa de existir.

II.1.3 Corantes Orgânicos

Os sensibilizadores orgânicos devem possuir uma estrutura dador-ponte conjugada π -aceitador a qual permita uma gama de absorção ampla até à zona do quase infravermelho ou do infravermelho (Figura II.1.4).

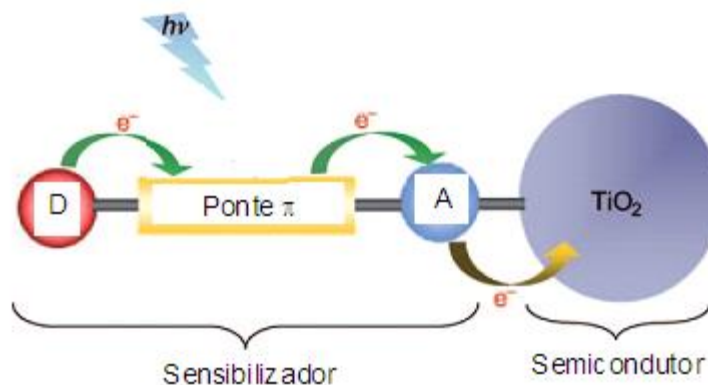


Figura II.1.4 Esquema da estrutura dos sensibilizadores orgânicos²

A excitação pela luz deve induzir uma separação de carga intramolecular dos fragmentos dador e aceitador do cromóforo. i.e. um efeito “push-pull” pronunciado.²⁹

Foram sintetizadas centenas de corantes orgânicos derivados de cumarinas,^{30,31} indolinas,^{32,33,34} tetra-hidroquinolinas,^{35,36} triarilaminas,³⁷ hetero-antracenos,³⁸ carbazoles,³⁹ N,N-dialquilanilinas,^{40, 12} hemicianinas,⁴¹ merocianinas,⁴² esquaranos,⁴³ perilenos,⁴⁴ antraquinanonas,⁴⁵ oligotiofenos.⁴⁶ Por outro lado também polímeros⁴⁷ e corantes naturais⁴⁸ têm sido adoptados como sensibilizadores para as DSCs e têm sido obtidas eficiências relevantes.¹⁶

Os estudos realizados sobre a relação estrutura-actividade dos corantes orgânicos permitem antever quais os compostos com coeficientes de extinção elevados que podem ser conseguidos através da combinação dos diferentes fragmentos dador-ponte conjugada-aceitador.²

A análise dos dados obtidos com o objectivo de saber qual o tipo de grupos dadores (**D**), pontes conjugadas π e aceptadores (**A**) que conduzem a sensibilizadores orgânicos em DSCs mais eficientes revela que os melhores grupos dadores vêm da família das arilaminas ricas em electrões: aminocumarinas, (difluorenil)fenilaminas, trifenilaminas e indolinas.²

As moléculas de corante que possuem grupos triarilaminas ou trifenilaminas foram intensamente investigadas devido à sua extraordinária capacidade de funcionarem como grupos electrodoadores e por possuírem uma configuração não planar que evita a agregação. A reduzida agregação dos corantes facilita a injeção electrónica interfacial ultra-rápida das moléculas do corante no estado excitado para a banda de condução do semiconductor. Por outro lado, a recombinação dos electrões injectados com o mediador redox pode ser suprimida devido à estrutura não planar da triarilamina.¹³ Adicionalmente, a unidade de trifenilamina oxidada encontra-se convenientemente orientada no espaço para que ocorra a aproximação do mediador redox de modo a assegurar a regeneração rápida do corante.¹³ A unidade triarilamina mostrou ser também um eficiente transportador de lacuna. A presença de um grupo metoxilo electrodoador no anel aromático adicional desvia o máximo de absorção para a zona do vermelho e aumenta a eficiência da célula para além de aumentar a capacidade electrodoadora do anel aromático.^{2,15}

Os melhores fragmentos para pontes conjugadas contêm frequentemente unidades tiofeno tais como os oligotiofenos, tienilenevinilenes ou ditienotiofenos devido às suas excelentes propriedades de transporte de carga, ou fenilenevinileno.²

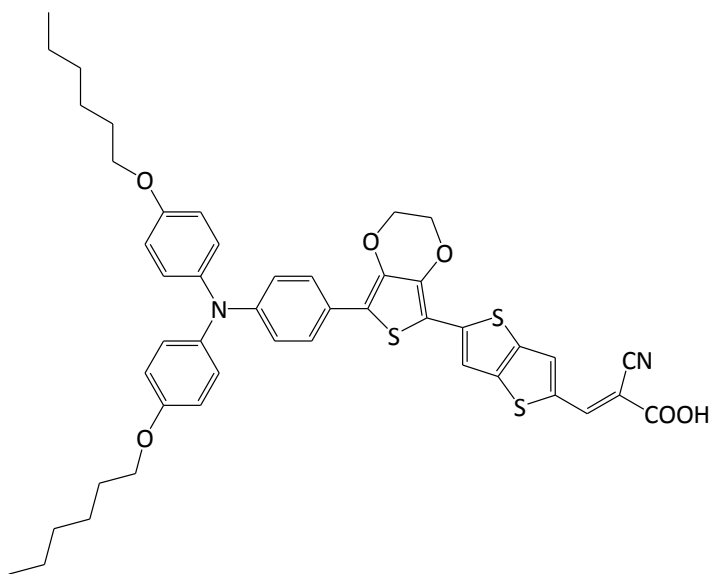
Estudos realizados com as tetra-hidroquinolinas por Sun, Yang *et al.* sobre a relação entre as estruturas dos corantes e a sua eficiência nas células permitiram concluir que a eliminação de uma ligação dupla C=C e a escolha de espaçadores de electrões adequados podem ser determinantes na eficiência das células. Estes autores consideraram que a baixa eficiência dos sensibilizadores que possuíam uma ligação dupla C=C era devida a um processo de torção, que conduz a uma fotoisomerização *cis-trans*. Estes resultados sugerem que a presença de uma estrutura molecular rígida ajuda a obter eficiências globais maiores.³⁶

Também o trabalho de Hagberg *et al.*²⁹ no qual se estudou o efeito de estender o sistema conjugado π entre o grupo dador (fragmento trifenilamina) e o grupo aceitador (fragmento ácido cianoacético) veio mostrar que a introdução de vários grupos tiofeno adicionais permitia ajustar os níveis de energia HOMO e LUMO da molécula e trazia uma maior estabilidade à molécula quando comparado com as pontes de polienos.⁴⁹

A variação do aceitador tem sido relativamente pequena e na maioria dos casos é utilizado o ácido cianoacrílico, com o ácido carboxílico incorporado no grupo aceitador. Pensa-se que o carácter de electroattractores do grupo ciano e do grupo carboxílico desempenha uma função importante na

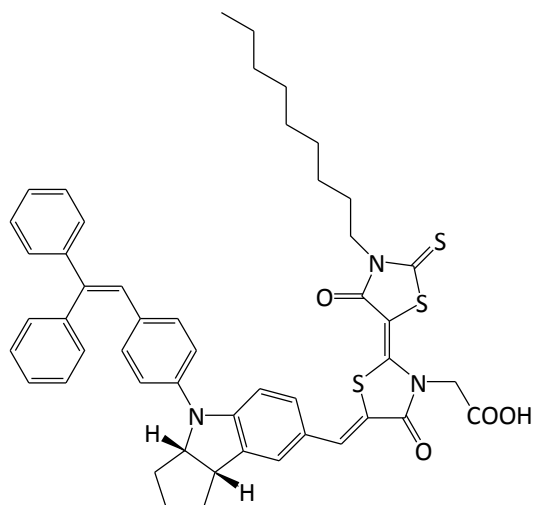
eficiência da injeção dos electrões.⁵⁰ O ácido rodanina-3-acético e a espécie dimérica resultante foram usados como segundo tipo de aceitadores e os seus derivados pertencem aos corantes com mais eficiência.²

Zhang *et al.* sintetizaram um corante promissor, o corante C217 (**9**), que possuía como grupo dador de electrões um grupo trifenilamina di-hexiloxi-substituído lipofílico, como grupo aceitador o ácido cianoacrílico hidrofílico e como ponte conjugada uma unidade 3,4-etilenodioxitiofeno, rica em electrões. Este sensibilizador deu origem a uma DSC com uma eficiência de 9,8% e uma elevada estabilidade.³⁷



Corante C217 (**9**)

Por outro lado, o grupo de Uchida desenvolveu um conjunto de sensibilizadores para DSCs à base de indolinas.



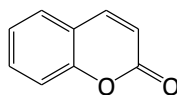
Corante D205 (**10**).

De entre eles destaca-se o corante D205 (**10**), sintetizado por Ito *et al.*, com uma estrutura em que o ácido rodanina 3-acético se encontra substituído com uma cadeia *n*-octilo para prevenir a agregação tendo sido obtida uma DSC com uma eficiência de 9,5%.⁵¹

Apesar dos resultados obtidos com esta geração de sensibilizadores com uma estrutura D- π -A serem notáveis e encorajadores, as eficiências de conversão permanecem inferiores às obtidas com os complexos de ruténio devido à absorção insuficiente da luz acima dos 700 nm. É importante por isso conceber novos sensibilizadores que exibam uma resposta espectral acrescida na zona do vermelho e do quase infravermelho por modificação estrutural dos corantes existentes. Uma vez que o número de estruturas é muito elevado, os estudos de química teóricos disponíveis podem servir de guia para seleccionar os candidatos mais promissores para a síntese.¹ Por outro lado, fazer uso e continuar os estudos já realizados que têm como objectivo compreender as origens moleculares das propriedades optoelectrónicas dos corantes com vista a estabelecer os “building blocks” requeridos para o design de sensibilizadores com uma maior eficiência pode também constituir uma abordagem interessante.⁵²

II.1.4 Corantes derivados de cumarinas

A cumarina (2*H*-cromen-2-ona) (**11**) é uma α -benzopirona i.e. é uma molécula que consiste de um anel benzénico fundido com uma α -pirona, um anel de lactona que possui também uma ligação dupla o que permite a extensão do sistema π conjugado ao longo de toda a molécula.



Cumarina (**11**)

Comum a todos os derivados de cumarinas usados nas aplicações de laser e das DSCs encontra-se um substituinte dador na posição 7, sendo o grupo amina o mais comum.

O efeito da presença deste grupo dador de electrões na posição 7 e/ou de um grupo electroatractor presente na posição 3 ou 4 consiste em assistir, através de efeitos indutivos e de ressonância, ao processo de transferência de carga intramolecular, que ocorre após a excitação por absorção de luz e que resulta na formação de um anel *para*-quinoidal em (b) a partir de um anel aromático (a) (Figura II.1.5).

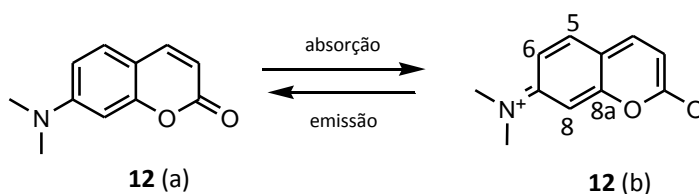


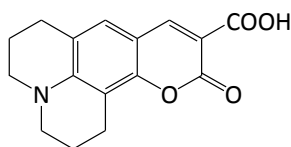
Figura II.1.5 Transferência de carga intramolecular (ICT) que ocorre na 7-dimetilaminocumarina (**12**) via absorção e emissão de luz.⁵²

A presença destes substituintes traduz-se num efeito “push-pull” da carga electrónica i.e. numa perturbação do anel aromático em ressonância para originar uma configuração estrutural *para*-quinoidal, no qual as ligações C5-C6 e C8-C8a são paralelas entre si e possuem um carácter de ligação dupla acrescido relativamente aos restantes átomos do anel aromático. Por isso, estas ligações são

mais curtas quando comparadas com as ligações dos átomos vizinhos, tal como foi descrito para algumas 7-hidroxycumarinas.⁵²

De entre os sensibilizadores orgânicos estudados para as DSCs, os derivados de cumarinas apresentam-se como candidatos promissores devido às suas boas propriedades de conversão fotoelétrica,⁶ à sua boa estabilidade a longo termo sob *one sun soaking*⁵³ e um nível de energia da LUMO adequado ao nível da banda de condução do TiO₂.⁵⁴

A cumarina C₃₄₃ (**13**), reconhecida como o primeiro sensibilizador desta família, mostrou ser um bom fotossensibilizador pois injectava eficientemente os electrões para a banda de condução do TiO₂. Foram observados tempos de injeção de electrões ultra-rápidos < 200 fs¹⁰ <20 fs⁵⁰ e 125fs.⁵⁵



Cumarina C₃₄₃ (**13**)

No entanto, produzia fotocorrentes baixas devido à baixa absorção da luz na zona do vermelho e quase-infravermelho³⁰ do que resultava uma eficiência η da DSC inferior ($\eta=0,9\%$) às observadas para os complexos de ruténio. Isto levou ao desenvolvimento de novos derivados de cumarinas que apresentassem espectros de absorção alargados e desviados para a zona do vermelho de modo a melhorar a colheita de luz e aumentar as eficiências de conversão.⁶

Os espectros de absorção dos sensibilizadores orgânicos podem ser desviados para a zona do vermelho por expansão da conjugação π nos corantes e por introdução de grupos electrodoadores e electroattractores na estrutura da molécula, os quais provocam desvios dos níveis de energia das orbitais moleculares HOMO e LUMO dos corantes. Tal como se referiu anteriormente, os potenciais da HOMO e da LUMO devem estar alinhados com o nível da banda de condução do semiconductor e com o potencial redox do mediador redox. Um desvio para a zona do vermelho no espectro de absorção diminui o fosso de energia entre a HOMO e a LUMO do corante. Para aceitar electrões, o nível da HOMO deve ser mais positivo do que o potencial redox do electrólito (no caso do electrólito I₃ é de 0,35V) e para injectar electrões o nível LUMO deve ser mais negativo do que o nível da banda de condução do semiconductor (-0,5 V).⁶

Com base no conceito de dador-ponte conjugada π -aceitador, foi sintetizado um conjunto de derivados de cumarina por modificação química da unidade cumarina como dador de electrões, por inserção de grupos tiofeno e metino como pontes conjugadas π e por introdução de diferentes grupos aceptadores para além do ácido cianoacrílico.

II.1.4.1. Efeito da variação da ponte conjugada π

Um conjunto de derivados de cumarinas possuindo a cumarina como grupo dador, o ácido cianoacético como aceitador de electrões e diferindo entre si na estrutura da ponte conjugada que os une foi sintetizado por Arakawa, Hara, Wang e colaboradores.

A introdução inicial de um grupo metino ($-\text{CH}=\text{CH}-$) a ligar o fragmento carboxílico ao núcleo da cumarina no composto NKX-2398 (**14**) provocou um ligeiro desvio do máximo de absorção para a zona do vermelho ($\lambda_{\text{máx}}=451$ nm) relativamente ao da cumarina C_{343} ($\lambda_{\text{máx}}=442$ nm), um aumento do coeficiente de extinção molar e conduziu a um aumento da eficiência da DSC resultante. (Tabela 1) A presença de um grupo ciano no composto **15** desviou o c.d.o. máximo para a zona do vermelho ($\lambda_{\text{máx}}=493$ nm) possibilitando uma melhor colheita de luz a partir do espectro solar, devido ao forte carácter electroatractor dos grupos ciano e carboxílico.

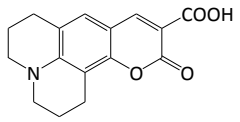
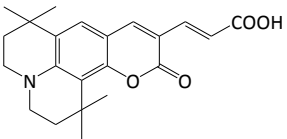
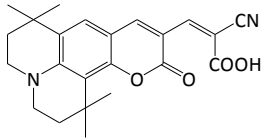
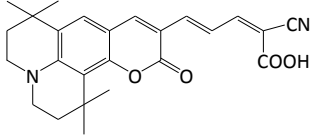
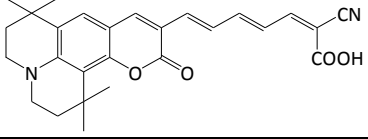
O aumento do número de unidades metino entre a cumarina e o ácido cianoacético deu origem aos compostos **1** e **16** cujos espectros de absorção apresentavam c.d.o. máximos desviados para a zona do vermelho numa extensão que é proporcional ao número de unidades metino ($-\text{CH}=\text{CH}-$) introduzidas na ponte conjugada.⁶ Estes desvios para a zona do vermelho, que traduzem uma diminuição do fosso entre a energia da HOMO e da LUMO do corante, são devidos a variações dos níveis da HOMO para níveis superiores (i.e. a desvios negativos do potencial de oxidação) e não a diminuições do nível da LUMO, tal como se apresenta na tabela II.1.1.^{6,16}

Os coeficientes de extinção molares (ϵ) dos compostos **1** e **16** também aumentaram com o número de unidades de metino introduzidas. O sensibilizador NKX-2311 (**1**) apresentou uma eficiência promissora de 5,2%. No entanto, a introdução de mais uma unidade metino no composto NKX-2311 (**1**) para formar o composto NKX-2586 (**16**) veio complicar o processo de síntese e tornar a molécula mais instável devido à possibilidade de formação de isómeros. Também se observou uma diminuição

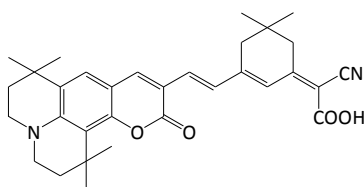
Introdução

do rendimento da injeção de electrões (e da eficiência de conversão η) do composto **16** que se deve à ocorrência de transferência de carga intermolecular a qual resulta da agregação do corante à superfície do TiO_2 .³⁰

Tabela II.1.1 Efeito da variação da ponte conjugada (π), por aumento do número de ligações duplas, na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.

Nº	Composto	Absorção		Emissão		Potenciais redox		Eficiência da DSC
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	T. de vida (ns)	Eox (HOMO)	Eox-E0-0 (LUMO)	
13		442	15100	470	4,0	1,21	-1,23	0,9 ⁶
14		451	45800	505	3,5	1,20	-1,31	3,4 ⁶
15		493	44200	540	1,7	1,35	-0,85	4,1 ⁶
1		504	51900	560	1,9	1,28	-0,82	5,2 ⁶
16		506	59100	610	0,9	1,15	-0,83	3,5 ⁶

Para evitar este processo, foram usados derivados do ácido desoxicólico, tendo sido observada uma melhoria do rendimento. Em condições optimizadas observou-se que as DSCs derivadas do corante **1** apresentavam valores de eficiência de 6,0 % sob AM (*air mass*) 1,5 G (espectro solar padrão utilizado para medidas de eficiência das células).⁶



NKX-2753 (**17**)

Foi também sintetizado o corante NKX-2753 (**17**) com um anel lateral ligado à cadeia o qual mostrou ser tão eficiente na prevenção da agregação como o ácido desoxicólico, tendo sido obtida uma eficiência de conversão de 5,7%.³⁰

Como alternativa à cadeia vinílica, Arakawa e colaboradores propuseram a introdução de fragmentos com anéis aromáticos como o tiofeno na cadeia metino do composto **1** para estender a conjugação π e aumentar a estabilidade do corante relativamente aos corantes com uma longa cadeia de grupos metino. Foram sintetizados os corantes NKX-2593 (**18**), NKX-2587 (**19**), NKX-2677 (**20**) e NKX-2697 (**21**) por introdução de uma, duas e três unidades de tiofeno, respectivamente.⁴⁹ Observou-se que a introdução de unidades de tiofeno não trouxe alterações significativas nos espectros de absorção dos corantes em solução apesar dos espectros de absorção destes sensibilizadores adsorvidos à superfície do TiO_2 apresentarem curvas muito mais alargadas o que indica uma melhor colheita de luz, conduzindo a um aumento da fotocorrente e da eficiência global. O sensibilizador NKX-2677 (**20**) exibiu uma injeção de electrões ultra-rápida de 100 fs e originou DSCs com 8,2% de eficiência.

As DSCs sensibilizadas com o corante NKX-2700 (**22**) apresentaram eficiência de 5,0% sem a presença de coadsorventes. No entanto, após adição de uma solução de 120 mM de ácido desoxicólico (DCA) antes da adsorção à superfície de TiO_2 foi atingido um valor de 8,2% para a eficiência de conversão (Tabela II.1.2).⁵⁴

Recentemente, Kim e colaboradores sintetizaram uma série de derivados de cumarinas com um grupo etilenodioxítiofeno rico em electrões, inserido na ponte conjugada π entre o anel da cumarina e o ácido cianoacético. De entre eles destacou-se o composto HKK-CM1 (**23**) cujo espectro de absorção apresenta um c.d.o. máximo desviado para a zona do vermelho ($\lambda_{\text{máx}}$ 532 nm) e a célula sensibilizada com este corante uma eficiência de 6,1% (Tabela II.1.2).⁵⁶

Introdução

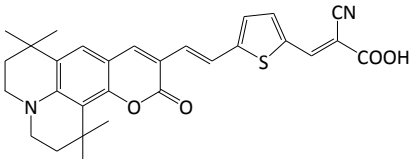
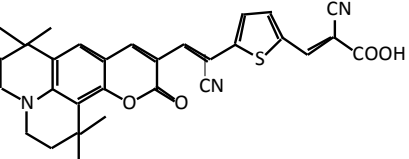
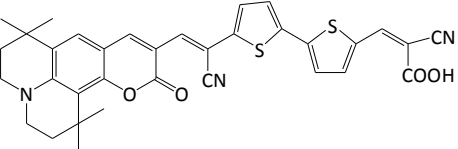
Tabela II.1.2 Efeito da variação da ponte conjugada (π) por introdução de fragmentos com anéis aromáticos na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.

Nº	Composto	Absorção		Emissão		Potenciais redox		Eficiência da DSC
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	T. de vida (ns)	Eox (HOMO)	Eox-E0-0 (LUMO)	η (%)
1		504	51900	560	1,9	1,28	-0,82	5,2 ⁶
18		510	71800	---	---	0,92	-0,92	6,3 ³¹
19		507	54300	556	2,4	1,01	-0,85	5,8 ²⁰
20		511	64300	572	1,0	0,93	-0,89	8,2 ²⁰
21		501	73300	577	0,8	0,91	-0,77	6,4 ²⁰
22		525	70000	----	----	0,82		8,2 ⁵⁴
23		532	52700	---	---	0,93	-1,13	6,1

II.1.4.2 Efeito da variação do grupo aceitador

Hara e colaboradores sintetizaram dois derivados de cumarinas NKX-2807 (**24**) e NKX-2883(**25**) que possuíam para além do grupo cianoacrílico habitual, um grupo ciano aceitador adicional e aplicaram-nos em DSCs (Tabela II.1.3). Verificaram que os corantes que possuíam um grupo ciano ligado à ponte conjugada π apresentavam espectros com o máximo de absorção desviados para a zona do vermelho e valores da energia da LUMO inferiores, quando comparados com os corantes que possuíam apenas um grupo ciano. De entre eles, o corante NKX-2883 (**25**) absorve mais intensamente a valores mais elevados de c.d.o. ($\lambda=552$ nm, $\epsilon=97400$ Lmol⁻¹cm⁻¹) do que o corante **20** ($\lambda=511$ nm, $\epsilon=64300$ Lmol⁻¹cm⁻¹) (Tabela II.1.3).³¹

Tabela II.1.3 Efeito da variação do grupo aceitador (A) na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.

Nº	Composto	Absorção		Emissão		Potenciais redox		Eficiência da DSC
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{v máx}}$ (nm)	T. de vida (ns)	Eox (HOMO)	Eox-E0-0 (LUMO)	η (%)
18		510	71800	---	---	0,92	-0,92	6,3 ³¹
24		566	57600	---	---	1,08	--0,60	4,3 ³¹
25		552	97400	---	---	0,97	-0,72	7,3 ³¹

A introdução de fragmentos catiónicos indolio, benzotiazolio e ácido (4-oxo-2-tioxo-tiazolidin-3-il) acético em conjugação com o anel de cumarina resultou num desvio do c.d.o. máximo para a zona do vermelho em todos os corantes NKX-2460 (**26**), NKX-2475 (**27**) e NKX-2195 (**28**), o qual foi atribuído ao carácter electroatractor forte destes fragmentos comparável aos grupos cianoacrílico.⁶

Introdução

A introdução dos fragmentos indolium e benzotiazolium nos corantes NKX-2460 (**26**) e NKX-2475 (**27**) conduziu também a um desvio do potencial de redução para valores de -0,35 V e -0,57 V devido ao carácter electroatractor das estruturas catiónicas destes fragmentos (Tabela II.1.4).⁶

Tabela II.1.4 Efeito da variação do grupo aceitador (A) por introdução de fragmentos heterocíclicos catiónicos na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.

Nº	Composto	Absorção		Emissão		Potenciais redox		Eficiência da DSC
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	T. de vida (ns)	Eox (HOMO)	Eox-E0-0 (LUMO)	η (%)
14		493	44200	540	1,7	1,35	-0,85	4,1
26		616	103000	490	3,2	1,18	-0,35	0,6 ⁶
27		578	59800	673	0,9	1,15	-0,57	1,1 ⁶
28		539	52200	580	2,5	1,22	-0,86	2,6 ⁶

II.1.4.3 Efeito da variação do grupo dador

Para além da variação da natureza da ponte conjugada (π) e do grupo aceitador (A) foi também estudada a influência do grupo dador (**D**) na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs de alguns derivados de cumarinas.

Observou-se que o espectro de absorção da cumarina NKX-2510 (**29**) que possui o grupo dietilamina apresenta um máximo de absorção que foi desviado para a zona do azul relativamente ao corante NKX-2311 (**1**) o que indica que a presença de uma estrutura de anel que inclua o grupo amina é importante para desviar o máximo de absorção para a zona do vermelho.⁶ Isto foi confirmado pela observação do espectro de absorção do derivado JK-35 (**30**) que apresentava um c.d.o. máximo desviado para a zona do azul e um valor de ϵ inferior ao do corante NKX-2677 (**20**).⁵⁷

Introdução

Foi também sintetizada uma série de sensibilizadores que possuíam como grupo dadores triarilaminas substituídas com dietilaminocumarinas. O composto SD-2 (**31**) apresenta um espectro de absorção com um c.d.o. máximo desviado para a zona do azul e um coeficiente de extinção molar inferior ao do sensibilizador NKX-2677 (**20**) originando uma DSC de eficiência inferior.⁵⁸

Tabela II.1.5 Efeito da variação do grupo dador (D) na absorção, emissão, nas propriedades electroquímicas e na eficiência das DSCs dos derivados de cumarinas.

Nº	Composto	Absorção		Emissão		Potenciais redox		Eficiência da DSC η (%)
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	T. de vida (ns)	Eox (HOMO)	Eox-E0-0 (LUMO)	
29		480	49800	535	1,4	1,08	-1,2	4,7 ⁶
1		504	51900	560	1,9	1,28	-0,82	5,2 ⁶
20		511	64300	572	1,0	0,93	-0,89	8,1
30		431	39000	---	---	1,37	-1,03	4,34 ⁵⁷
31		465	51000	640	---	---	---	6,0 ⁵⁸

Os tempos de vida de emissão de todos estes novos corantes derivados de cumarinas, que se encontram na gama de valores compreendida entre 0,9-3,5 ns, são tempos de vida inferiores aos observados para os complexos de ruténio. No entanto, se a injeção de electrões for mais rápida do que os tempos de vida destes corantes, a injeção efectiva de electrões não vai ser evitada e consequentemente eles vão ser fotossensibilizadores eficientes.⁶

II.1.4.4. Medidas de FT-IR e análise de estudos de cálculos da estrutura do corante NKX-2311 (1)

De modo a compreender a estrutura do corante adsorvido à superfície do TiO_2 , foram realizadas medidas de absorção FT-IR e estudos de cálculos teóricos para o corante NKX-2311 (1).

Foram realizados espectros de FT IR do corante NKX-2311 (1) adsorvido à superfície do TiO_2 e comparados com os espectros do corante NKX-2311 (1) na forma de ácido carboxílico e na forma de carboxilato. Estes estudos revelaram que o corante se encontra ligado à superfície do semiconductor por coordenação do carboxilato e não por uma ligação tipo éster.⁶

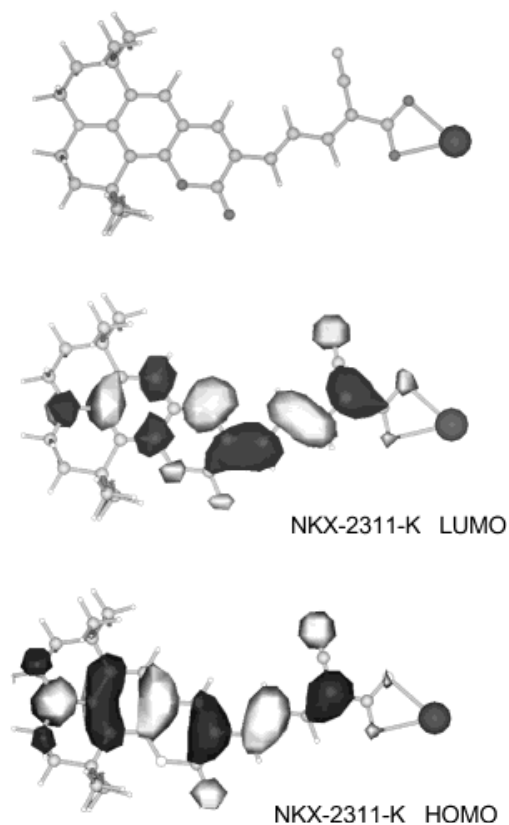


Figura II.1.6 Estrutura e HOMO e LUMO do sal de potássio do corante 1 otimizados ao nível B3LYP/3-21G*⁶

Para modelar o estado electrónico do corante adsorvido à superfície do TiO_2 , foi usado um sal de potássio do corante pois o corante deve estar ligado na forma de carboxilato, com base em estudos prévios segundo os quais os compostos orgânicos ou inorgânicos que possuem um ou mais grupos carboxílicos encontram-se adsorvidos às superfícies dos metais ou óxidos metálicos através da coordenação com carboxilatos bidentados.⁶ A geometria do corante NKX-2311 (**1**) foi otimizada pelo método B3LYP com a base 3-21G*.

Uma série de cálculos realizada com o objectivo de encontrar a conformação mais estável mostrou que a conformação mais estável era aquela em que os átomos de oxigénio do carbonilo da cumarina e o de azoto do grupo ciano se encontravam o mais afastados possível devido à forte repulsão estereoquímica.

A comparação da distribuição electrónica entre as orbitais moleculares revela que a excitação do electrão do nível HOMO para LUMO fez deslocar a distribuição electrónica da cumarina para o fragmento metino. Como consequência, os electrões são injectados para o TiO_2 via o grupo carboxílico ligado directamente ao grupo metino. Por isso, este grupo é importante para a transferência de electrões efectiva neste sistema. A mudança de distribuição electrónica induzida pela fotoexcitação pode ser considerada como um dos factores determinantes para a eficiência da separação de carga.⁶

II.1.5 A formação de ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-N}$ e $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-C}_{\text{sp}}$ por catálise de paládio

II.1.5.1 Síntese de aminas aromáticas catalizada por paládio

As aminas aromáticas são compostos ubíquos em inúmeros campos da química. Estão presentes em produtos naturais, fármacos,⁵⁹ materiais fotográficos e xerográficos,⁶⁰ polímeros condutores⁶¹ e componentes de díodos emissores de luz (OLED) orgânicos.⁶²

Tradicionalmente esta classe de compostos era preparada por métodos clássicos tais como a nitração e redução, a aminação redutiva, a adição a intermediários benzino ou pela substituição nucleofílica directa de halogenetos aromáticos ou heteroaromáticos pobres em electrões.⁶³ A importância óbvia das arilaminas e a escassez de métodos gerais para a sua preparação conduziu à procura de técnicas catalíticas para a sua síntese.⁶⁴

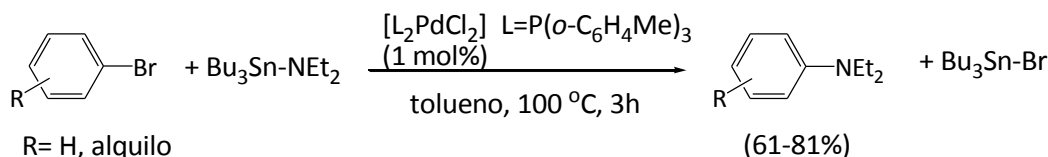
Ao longo dos anos, foi relatado um elevado número de métodos racionais e extremamente úteis para a formação da ligação C-N. Nenhum deles é isento de inconvenientes: as condições reaccionais rigorosas (severas), a fiabilidade e o custo.⁶⁴ Embora seja bem estabelecido que os halogenetos de arilo reagem com as aminas usando como catalizador o cobre, são requeridas temperaturas muito elevadas e conseguida uma baixa selectividade.⁶⁵

De entre os desenvolvimentos mais importantes da síntese orgânica nos últimos anos surgem os procedimentos de acoplamento cruzado catalizados pelo paládio e pelo níquel desenvolvidos por Kumada,⁶⁶ Stille,⁶⁷ Suzuki,⁶⁸ Negishi⁶⁹ e que tiveram impacto na formação de ligações C-N aromáticos.⁶⁴ O trabalho independente das equipas de Hartwig e Buchwald vieram abrir um novo capítulo na área da química do acoplamento cruzado catalizado por metais de transição com uma nova estratégia para sintetizar anilinas e éteres arílicos.

O trabalho desenvolvido pelos grupos de Buchwald e Hartwig teve como objectivo desenvolver sistemas catalíticos eficientes para as reacções de formação das ligações $\text{Csp}^2\text{-N}$ de um modo experimentalmente simples e em condições de operação suaves, os quais deviam obedecer a uma série de requisitos: i) deviam funcionar tanto para sistemas aromáticos ricos em electrões como para sistemas deficientes em electrões, ii) deviam funcionar para uma grande variedade de aminas, iii) deviam apresentar uma boa compatibilidade para diferentes grupos funcionais, iv) o catalizador e o ligando deviam estar comercialmente disponíveis a custos razoáveis, v) deviam ser capazes de operar com pequenas quantidades de catalizador e de ligando, vi) deviam funcionar com ligações $\text{Csp}^2\text{-X}$ em que X pode ser Cl, Br, I e OTf e outros substractos sulfonatos, vii) a reacção devia ser utilizável tanto em pequena como em larga escala

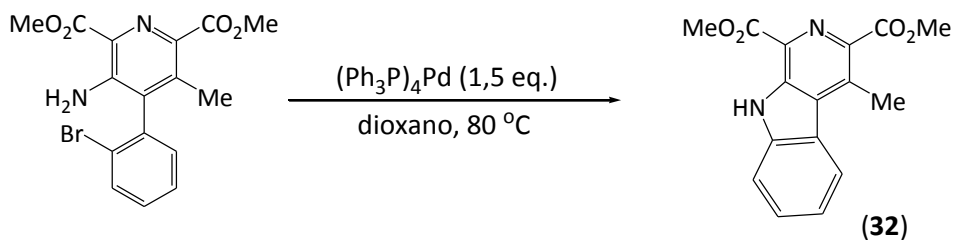
O primeiro estudo da química de acoplamento catalizada por paládio para formar aminas foi descrito por Migita e colaboradores em 1983 ao obterem, com rendimentos de moderados a bons, anilinas por reacção de brometos de arilo electronicamente neutros com amidas de estanho em presença de quantidades catalíticas de paládio e de tri-*orto*-tritoluilfosfina: $[(o\text{-tol})_3\text{P}]_2\text{PdCl}_2$ (Esquema II.1.1).⁷⁰ Esta descoberta estava limitada pela necessidade de usar amidas de tributilestanho (aminoestanos) tóxicas e instáveis. Por outro lado, apenas dialquilamidas de estanho não impedidas originavam aminas aromáticas com bons rendimentos.⁶⁵

Introdução



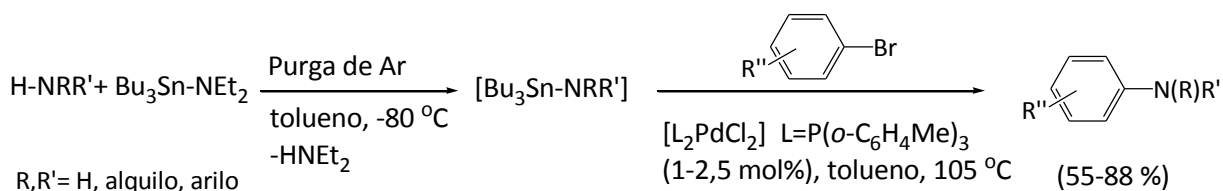
Esquema II.1.1 Síntese de aminas aromáticas catalizada por paládio a partir de brometos de arilo e amidas de estanho.⁷⁰

Adicionalmente, Boger e Panek relataram uma reacção de arilação intramolecular de uma amina primária mediada por quantidades estequiométricas de Pd(0) da qual resultava um heterociclo utilizado na síntese da lavendamicina (**32**), um produto natural isolado de *Streptomyces lavendulae* o qual possui actividade antibiótica e antiproliferativa.⁷¹ No entanto, estes autores não conseguiram converter esta reacção numa transformação catalítica uma vez que quando era utilizada uma concentração 1 mol% do catalizador a reacção não ocorria, presumivelmente devido à ausência de uma base.⁶⁵



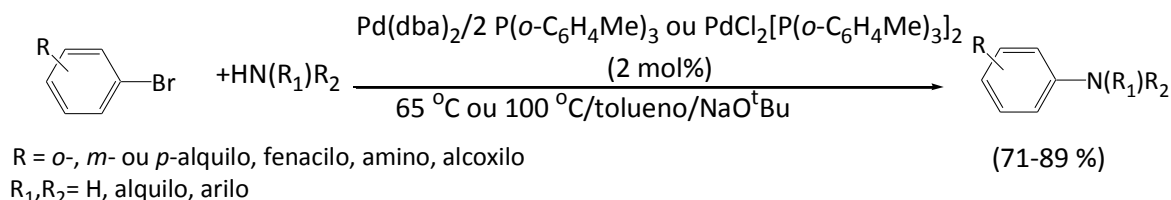
Esquema II.1.2 Síntese de lavendamicina catalizada por paládio.⁷¹

Em 1994, Buchwald e Guram descreveram um novo procedimento catalítico com base no trabalho de Migita, no qual a amida de estanho era gerada *in situ* por uma reacção de troca de amina. Procedendo a uma pré-mistura de N,N-dietilamino estanano com a amina secundária e à remoção da dietilamina volátil por purga com árgon, era conseguida a síntese do composto aminoestanano. Procedia-se então ao acoplamento entre este intermediário (N,N-dialquilamino)tri-*n*-butilestananos e diferentes halogenetos de arilo (com grupos alcóxicarbonilo, amina e alcóxido) com rendimentos moderados a bons mas ainda necessitando do uso de quantidades estequiométricas de compostos de tributilestanho. Estes resultados combinados com os de Migita conduziram assim à primeira metodologia de acoplamento cruzado catalizado por paládio para a formação de derivados da anilina (Esquema II.1.3).⁷²



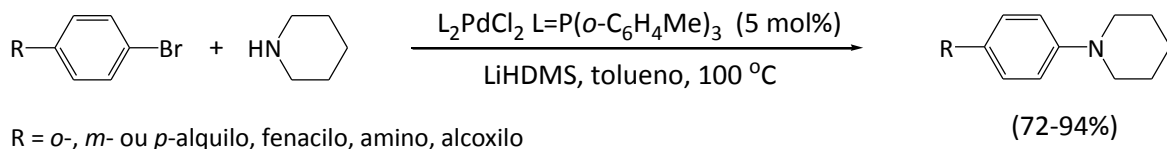
Esquema II.1.3 Síntese de aminas aromáticas por reacção de halogenetos de arilo com amidas de estanho geradas *in situ*.⁷²

As limitações associadas ao uso de compostos de estanho nesta química foram ultrapassadas pelo trabalho dos grupos de Buchwald e Hartwig concorrentemente em 1995. O uso de *ter*-butóxido de sódio como base permitiu a Guram *et al.* efectuar a formação catalítica de uma ligação C-N.⁷³ A amida de sódio gerada *in situ* por desprotonação da amina pôde ser usada em vez do aminoestano correspondente. O complexo isolado $[\text{P(o-tol)}_3]_2\text{PdCl}_2$ ou o catalisador gerado pela mistura de Pd_2dba_3 ($\text{dba} = \text{trans, trans-dibenzilidenoacetona}$) e dois equivalentes de $(\text{o-tol})_3\text{P}$ [$\text{P(o-C}_6\text{H}_4\text{CH}_3)_3$] permitiram a formação da ligação C-N com eficiências comparáveis. Por outro lado, verificou-se que na ausência de catalizador de paládio não ocorria a formação de produto.



Esquema II.1.4 Síntese de aminas aromáticas catalizada por paládio em presença de *ter*-butóxido de sódio.⁷³

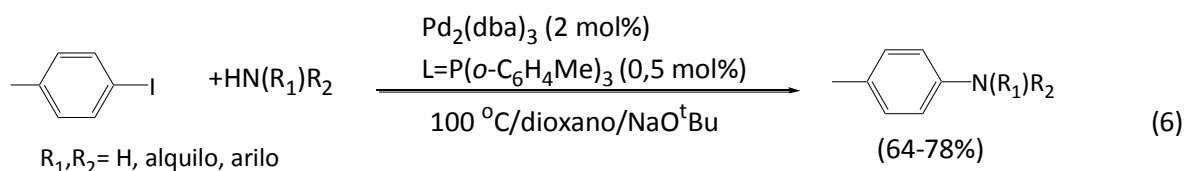
Paralelamente, Hartwig e Louie relataram que a hexametil disililazida de lítio $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ (LHMDS) também era uma base útil para estas transformações e que na presença do complexo catalítico $[(\text{o-tol})_3\text{P}]_2\text{PdCl}_2$ a reacção de arilação da amina ocorria com bons rendimentos.⁷⁴



Esquema II.1.5 Síntese de aminas aromáticas terciárias a partir da piperidina, catalizada por paládio em presença de hexametil disililazida de lítio $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$.⁷⁴

Esta metodologia funciona bem tanto para brometos de arilo ricos em electrões como para brometos de arilo deficientes em electrões. As amins primárias funcionam moderadamente bem em substratos deficientes em electrões e/ou orto-substituídos.⁶⁴ No entanto usando este sistema de ligandos, o acoplamento das amins primárias com outros brometos de arilo era ineficiente.

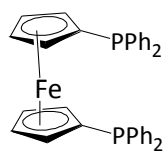
A utilização de complexos catalíticos que utilizam como catalizador $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ e como ligando $\text{P}(o\text{-C}_6\text{H}_4\text{Me})_3$ resulta também para a aminação de iodetos de arilo tendo sido obtidos produtos com rendimentos elevados.



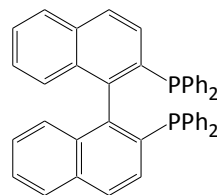
Esquema II.1.6 Síntese de amins aromáticas a partir de iodetos de arilo catalizada pelo sistema catalítico $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ e $\text{P}(o\text{-C}_6\text{H}_4\text{Me})_3$ em presença de *ter*-butóxido de sódio.

Observou-se que era importante utilizar o dioxano como solvente para obter melhores rendimentos e que neste solvente as amins secundárias constituíam substratos adequados enquanto a reacção das amins primárias com iodetos de arilo não impedidos, incluindo a anilina, originava produtos com rendimentos baixos mesmo com iodetos de arilo não impedidos.⁷⁵

Em 1996 foram publicados dois trabalhos pelos grupos de Buchwald e de Hartwig separadamente nos quais são descritas reacções de aminação com complexos catalíticos de paládio chamados de “segunda geração” os quais são formados com as fosfinas aromáticas quelantes bidentadas DPPF [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno] (**33**)⁷⁶ e BINAP [2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftil] (**34**).⁷⁷

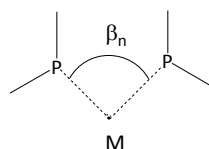


DPPF
(33)



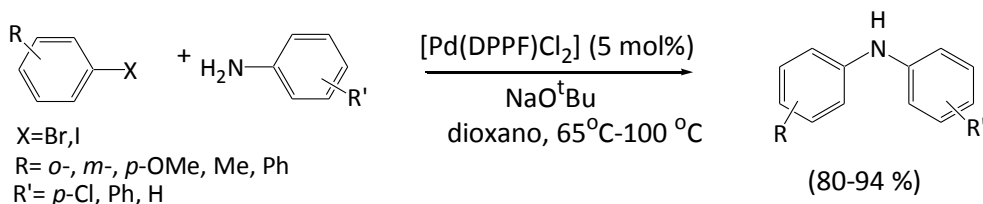
BINAP
(34)

Tem sido realçada a importância da natureza das estruturas destes ligandos bidentados, como factor determinante na velocidade e selectividade de uma reacção pela geometria específica dos ligandos à volta do centro catalítico. Essa geometria, definida pelo ângulo de quelação átomo dador(P)-metal (M)-átomo dador (P) (*bite angle* β_n) (35), é fortemente dependente da ponte entre os dois ligandos e está intimamente relacionada com o ângulo diédrico estabelecido pelos átomos de fósforo no ligando o qual influencia a actividade catalítica e a enantioselectividade de muitas transformações assimétricas. Por isso, complexos metálicos com um *bite angle* determinado podem estabilizar determinadas geometrias e induzir distorções a outras geometrias de forma a desestabilizá-las. Desta forma numa reacção, a fase inicial, o estado de transição e o estado final do complexo metálico envolvido podem ser influenciados estereoquimicamente.⁷⁸



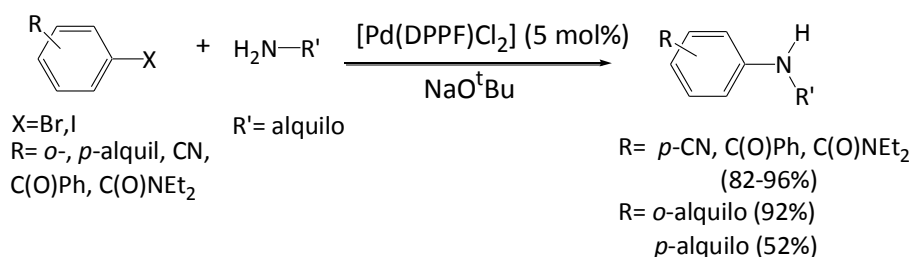
(35)

A utilização destes complexos de paládio permitiu a reacção dos brometos e iodetos de arilo com alquilaminas primárias, com aminas secundárias cíclicas e anilinas.⁶⁵ Assim, a reacção dos halogenetos de arilo com anilinas em presença de complexos de paládio com o ligando DPPF ocorreram com rendimentos quase quantitativos.



Esquema II.1.7 Síntese de aminas aromáticas a partir de anilinas em presença de um complexo catalítico de “segunda geração”.⁶⁵

Os complexos de paládio com o ligando DPPF catalizaram também com bons rendimentos a síntese de alquilarilaminas a partir de alquilaminas primárias com uma variedade de substratos (Esquema II.1.8).



Esquema II.1.8 Síntese de alquilarilaminas em presença de um complexo catalítico de “segunda geração”.⁶⁵

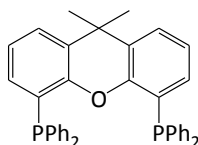
Os halogenetos de arilo com grupos electrotractores originaram produtos com rendimentos quantitativos enquanto que a partir de halogenetos de arilo neutros se conseguiram produtos com rendimento inferiores, dependendo da posição dos substituintes.⁷⁶

As reacções entre halogenetos de arilo e alquilaminas catalizadas por complexos de paládio que usavam como ligando BINAP eram mais selectivas (a razão monoarilado/diarilado era superior) e com rendimentos superiores àquelas em que os catalisadores eram formados por DPPF ou outros ligandos quelantes.⁷⁹ O sistema catalítico Pd/BINAP mostrou ser muito eficiente para a arilação de aminas primárias incluindo aminas ramificadas ou que possuam grupos funcionais como olefinas ou acetais. Foram também obtidos bons resultados para a reacção de arilação de aminas secundárias cíclicas apesar das acíclicas serem menos reactivas.⁷⁹

Pensa-se que a eficiência do BINAP na reacção de arilação das aminas primárias catalizada por paládio pode resultar da sua capacidade de inibir a formação de complexos bis(amina) halogeneto de arilo de paládio e outros complexos cataliticamente inactivos presumivelmente através da quelação de ambos os grupos fosfina do ligando ao metal. Isto foi evidenciado pelas diferenças de reactividade entre o BINAP e o composto 2-difenilfosfina-1,1'-binaftil.⁷⁹ Por outro lado, observou-se que a dissociação de um braço do ligando quelante conduzia ao aumento da eliminação do β -hidreto. Por isso a rigidez da estrutura binaftilo do ligando e o ângulo *bite* do BINAP (92,7 °) inferior ao observado

para o DPPF (99,1 °) conduz provavelmente à formação de um quelato mais forte. Também o tamanho relativamente grande do BINAP relativamente aos outros ligandos pode desfavorecer a dupla arilação da amina primária e promover a eliminação reductiva para dar o produto de monoarilação.⁷⁹

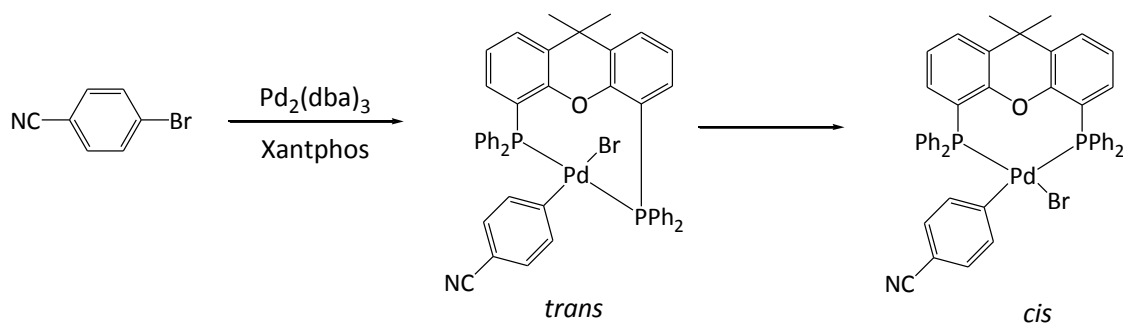
Um outro sistema composto por Pd(OAc)₂ como fonte de paládio em combinação com o ligando Xantphos (9,9'-dimetil-4,6-bis(difenilfosfano)xanteno) (**36**) foi utilizado para catalizar a reacção de brometos de arilo com aminas alifáticas, anilinas e aminas secundárias cíclicas, tendo sido observadas velocidades de reacção e graus de conversão elevados.⁸⁰



Xantphos (**36**)

O Xantphos é um ligando quelante bidentado de fosfina ou seja é um ligando de segunda geração desenvolvido pela equipa de Van Leeuwen. No entanto, apesar de ser utilizado em vários tipos de reacções, a razão da sua elevada eficiência não foi ainda inteiramente compreendida. Mais tarde, os grupos de Van Leeuwen e de Buchwald demonstraram que o Xantphos serve como ligando *trans*-quelante quando ligado ao Pd(II). O seu ângulo de quelação nestes complexos é grande (cerca de 153°) o que se deve à interacção entre o átomo de oxigénio do ligando e o átomo de paládio no produto da adição oxidativa.

A interacção entre os átomos de paládio e de oxigénio pode facilitar os passos chave do ciclo catalítico promovendo a dissociação de um fragmento fosfina do Xantphos do centro metálico. Assim, para que a eliminação reductiva ocorra a partir de um complexo *trans*-quelante ela tem de ser precedida por uma isomerização *trans cis*, o que pode ocorrer através da dissociação de um dos grupo fosfina do ligando (Esquema II.1.9).⁸¹



Esquema II.1.9 Isomerização *trans-cis* no complexo catalítico.

O uso de acetato de paládio em combinação com o Xantphos permitiu o acoplamento da *o*-anisidina com o brometo de arilo com bom rendimento, enquanto que as fosfinas com ângulos de quelação inferiores ou as monofosfinas mostraram ser ineficientes.^{80,82} Por outro lado, este sistema catalítico permitiu realizar reacções como a *N*-arilação de heteroarilaminas e amidas, o acoplamento de halogenetos de arilo *orto*-funcionalizados sensíveis a base, ou a *N*-arilação de 2-oxazolidinonas.⁸³

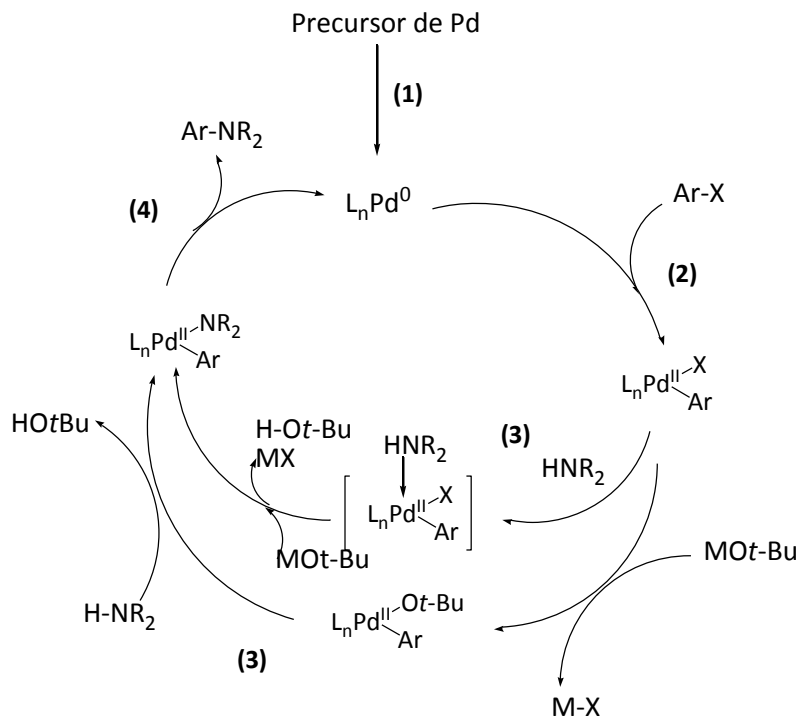
Posteriormente, o trabalho de Nishiyama *et al.* veio relatar a síntese de *N*-arilpiperazinas catalizadas por acetato de paládio e tri-*tert*-butilfosfina.⁸⁴ Por incluir um ligando alquilado monodentado impedido estereoquimicamente e rico em electrões, o sistema catalítico correspondente foi denominado de “terceira geração”.

Mais tarde o trabalho desenvolvido pelo grupo de Hartwig teve como objectivo desenvolver sistemas catalíticos de terceira geração que permitissem o acoplamento de cloretos de arilo em condições suaves. Os estudos mecanísticos realizados com alquilfosfinas impedidas conduziram a condições reaccionais que permitiram um acoplamento de alquilaminas secundárias com cloretos de arilo invulgarmente rápido.⁷⁷

Posteriormente, a utilização de outras classes de ligandos tais como os dialquilaril fosfanos, os ligandos QPhos, os derivados JosiPhos e de outras classes de ligandos que incluem os fosfatanos Verkad's, os óxidos de fosfano secundários e os carbenos N-heterocíclicos permitiram ampliar a gama de substratos e suavizar as condições reaccionais.⁸⁵

O mecanismo para a síntese de aminas aromáticas está apresentado no Esquema II.1.10 e procede por passos idênticos aos das reacções de acoplamento C-C catalizadas por paládio tais como a adição oxidativa, a formação da ligação amida paládio e a eliminação reductiva.

No decurso do trabalho desenvolvido sobre esta reacção tem havido um grande interesse em determinar quais as espécies de paládio intermediárias que se encontram envolvidas em cada um dos passos e foram realizadas algumas revisões mecanísticas à medida que os dados iam sendo recolhidos.



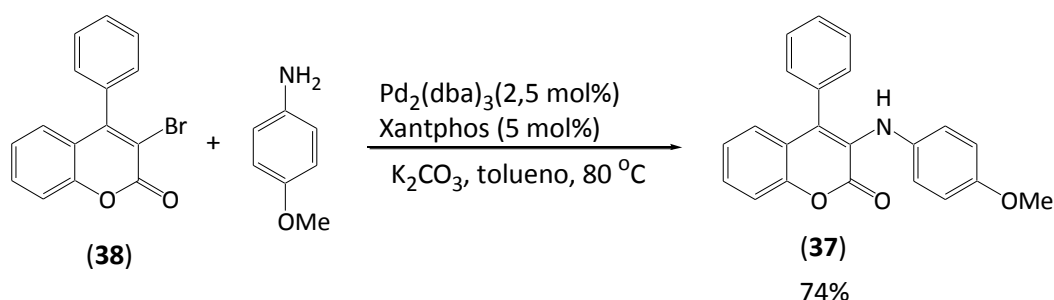
Esquema II.1.10 Ciclo catalítico proposto por Buchwald-Hartwig.⁸⁶

O ciclo catalítico proposto para a reacção de Buchwald-Hartwig geralmente aceite compreende os seguintes passos: (1) a conversão de um precursor de paládio num dos intermediários participantes do ciclo catalítico, (2) a adição oxidativa do intermediário paládio $Pd(0)$ ao halogeneto de arilo com a clivagem da ligação covalente C-X, (3) a substituição do halogeneto (ou pseudohalogeneto) pelo nucleófilo formando a espécie arilamida de paládio(II) pelo deslocamento directo do halogeneto pela amida ou através da formação de um intermediário alcóxido de paládio(II), (4) a eliminação redutiva da ligação C-N resulta na formação da arilamina desejada e na regeneração do catalizador de paládio $Pd(0)$ (Esquema II.1.10).

II.1.5.2 Reacção de Buchwald-Hartwig em cumarinas

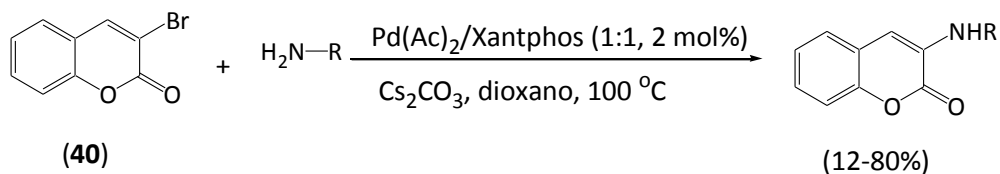
Apesar dos avanços significativos que ocorreram no desenvolvimento de métodos de aminação de halogenetos de arilo catalizadas por paládio, a aplicação destes às várias estruturas heterocíclicas ainda constitui uma área pouco explorada.

Em 2007, Wu e colaboradores descreveram a síntese de 3-aminocumarinas por acoplamento de 3-bromocumarinas com anilinas utilizando o sistema catalítico $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{Xantphos}$ em presença de K_2CO_3 em tolueno (Esquema II.1.11).⁸⁷



Esquema II.1.11 Síntese de 3-amino-4-aryl-cumarina (**37**) a partir de 3-bromo-4-aryl-cumarina (**38**) e *p*-anisidina na presença do sistema catalítico $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{Xantphos}$.⁸⁷

No mesmo ano, Audisio *et al.* apresentaram uma estratégia geral de síntese de 3-aminocoumarinas por acoplamento catalizado por paládio partindo de 3-bromocoumarinas com uma grande variedade de nucleófilos azotados, que incluem amidas, carbamatos, ureias e aminas funcionalizadas. Foi demonstrado que, de entre outros, o sistema catalítico $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{Xantphos}$ na presença de carbonato de cério em dioxano constituía um protocolo versátil para a preparação de diferentes coumarinas 3-*N*-substituídas bem como de outras estruturas heterocíclicas como as quinolin-2(1*H*)-onas 3-*N*-substituídas (Esquema II.1.12).⁸⁸



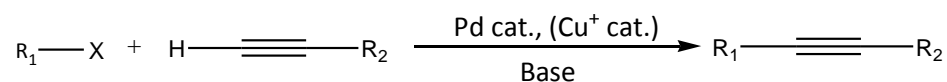
Esquema II.1.12 Método geral de síntese de 3-aminocoumarinas na presença do sistema catalítico $\text{Pd}_2(\text{dba})_3/\text{Xantphos}$.⁸⁸

Posteriormente, Soussi *et al* vieram expandir ainda mais o campo de aplicação deste método a outros substratos halogenados como 3-bromoquinolin-2(1*H*)-onas e 3-iodo-2*H*-cromenos e uma

grande variedade de nucleófilos azotados com amidas, azoles, lactamas, sulfonamidas, anilinas, aminas e ureia.⁸⁹

II.1.5.3 Acoplamento de Sonogashira-Hagihara

A reacção de acoplamento sp^2 - sp catalisada por paládio entre halogenetos ou triflatos de arilo ou de alquenilo e alcinos terminais, com ou sem a presença de um co-catalisador de cobre tornou-se o método mais importante de preparar arilalcinos e eninos conjugados que são precursores de produtos naturais, fármacos e materiais orgânicos (Esquema II.1.13).⁹⁰



R_1 = aril, heteroaril e vinil

R_2 = aril, heteroaril, alquenil, alquil, SiR_3

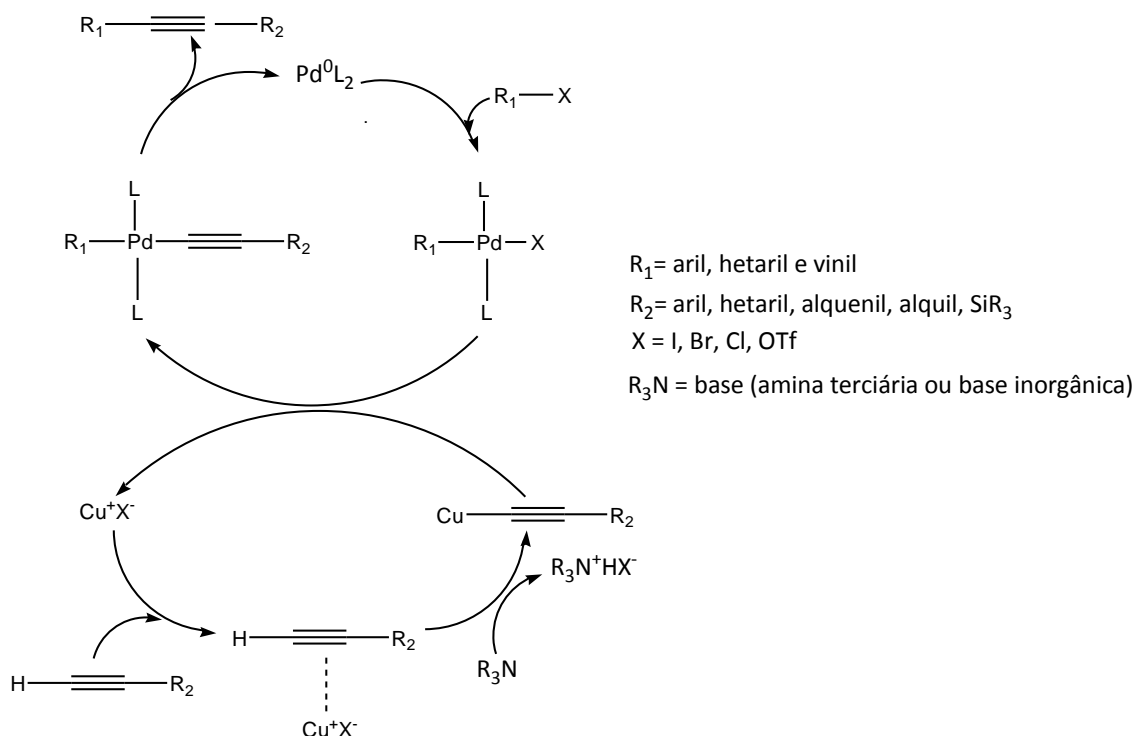
X = I, Br, Cl, OTf

Esquema II.1.13 Reacção de Sonogashira co-catalizada com cobre.⁹⁰

O mecanismo exacto da reacção de Sonogashira co-catalizada com cobre é ainda desconhecido, com alguns pontos obscuros devido à dificuldade de isolar e caracterizar os intermediários organometálicos a partir de uma mistura homogénea. Pensa-se que a reacção de Sonogashira co-catalizada com cobre ocorre através de dois ciclos catalíticos independentes, como se apresenta no Esquema II.1.14.

O ciclo catalítico geralmente aceite para a catálise com o paládio consiste na adição oxidativa de R_1-X ao catalisador de paládio. Pensa-se que o catalisador real é Pd^0L_2 de 14 electrões formado a partir de espécies de $\text{Pd}(0)$ tais como $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ por perda de dois ligandos ou, por redução de espécies de paládio(II) sob determinadas condições reaccionais. O complexo de paládio formado $[\text{Pd}(\text{II})\text{R}_1\text{L}_2\text{X}]$ (esquema II.1.14) sofre reacção de transmetalacção com o acetato de cobre (formado no ciclo de cobre paralelo) sendo transformado na espécie $[\text{Pd}(\text{II})\text{L}_2\text{R}_1(\text{C}\equiv\text{CR}_2)]$. Após isomerização cis/trans o aduto sofre eliminação redutiva originando o alcino final com regeneração da espécie de paládio(0) $[\text{Pd}(0)\text{L}_2]$.⁹⁰

No passo da adição oxidativa, as características de R_1-X são determinantes, sendo este passo facilitado se $X=I$, OTf e se a densidade electrónica na ligação C-X for reduzida devido à presença de grupos electroattractores.



Esquema II.1.14 Ciclo catalítico da reacção de Sonogashira co-catalizada com o cobre⁹¹

O ciclo do cobre não foi ainda completamente esclarecido. Muitas vezes é proposto que a base (em geral uma amina) abstrai um protão acetilénico do alcino terminal, formando, em presença de um sal de cobre, um acetalete de cobre. No entanto, as aminas geralmente usadas não são bases suficientemente fortes para desprotonar o alcino de modo a gerar o nucleófilo aniónico que forma o acetalete de cobre. Foi então proposto que o sal de cobre (I) se comporta como um ácido de Lewis, coordenando-se com a ligação tripla. Esta coordenação altera a densidade electrónica na ligação C-H acetilénica, tornando-a mais ácida. Deste modo, o protão acetilénico pode ser removido por aminas simples levando à formação do acetalete de cobre.⁹²

Em condições homogêneas, a reacção de Sonogashira é em geral realizada usando um complexo de paládio-ligando fosfano como catalisador na presença de uma quantidade catalítica de um sal de cobre (I) e de uma amina usada como solvente ou em grande excesso.⁹⁰

Os catalisadores de paládio mais comuns são os complexos de trifenilfosfanos $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ e $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ sendo este o mais usado devido ao facto de apresentar uma maior solubilidade e estabilidade. Foram também usados catalisadores com ligandos bidentados tais como $\text{Pd}(\text{dppe})\text{Cl}_2$, $\text{Pd}(\text{dppp})\text{Cl}_2$ ou $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$.⁹⁰ Frequentemente são requeridas quantidades de catalizador de paládio (acima dos 5 mol%) e quantidades superiores de sais de cobre (I).

Observou-se que a mudança de ligandos de trifenilfosfanos para outros ligandos fosfanos mais ricos em electrões favorecia a inserção oxidativa aos halogenetos de arilo. Por outro lado, a dissociação que origina a espécie Pd^0L_2 , necessária à adição oxidativa era também favorecida pelo uso de ligandos volumosos com um impedimento estereoquímico grande nos complexos de paládio – bifosfinas.⁹³

Um exame cuidadoso dos procedimentos publicados revelou algumas dificuldades que podem afectar a eficiência dos acoplamentos de Sonogashira: i) a reactividade dos brometos de arilo são geralmente baixas, razão pela qual têm de ser usadas condições extremas; ii) nalguns casos, são conseguidos rendimentos aceitáveis apenas após purificação dos reagentes e com a exclusão estrita do oxigénio, diminuindo a praticabilidade do método e iii) nas condições do acoplamento de Sonogashira, o homo-acoplamento oxidativo do alcino dando origem ao diino correspondente simétrico também é catalisado pelo oxigénio se estiver presente.⁹⁴

A formação *in situ* dos acetaletos de cobre nas condições reaccionais favorece a formação de produtos resultantes do homo-acoplamento do alcino terminal (o acoplamento de Glaiser) quando exposto ao ar.⁹⁵ Apesar destas reacções serem, de um modo geral, reacções úteis do ponto de vista da síntese e das aplicações, quando o objectivo é obter produtos do acoplamento cruzado, esses produtos tornam-se indesejados.

Uma estratégia para diminuir a reacção do homo-acoplamento consiste em reduzir a quantidade de oxigénio presente na reacção. Embora a maioria das reacções seja realizada em atmosfera inerte, a reacção em si não está totalmente desprovida de oxigénio e, enquanto o oxigénio estiver presente na mistura reaccional, ele pode re-oxidar o Pd^0 a $\text{Pd}(\text{II})$, o qual cataliza por sua vez o homo-acoplamento. Este ciclo repete-se conduzindo à formação predominante de produto do homo-acoplamento até todo o oxigénio ser consumido. Isto pode controlar-se fazendo uso de uma atmosfera redutora para eliminar o oxigénio em excesso.⁹⁵

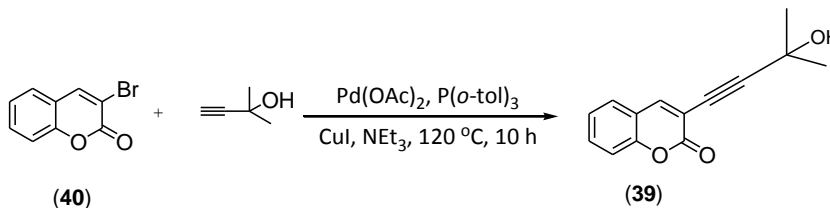
Uma vez que o produto do homo-acoplamento de Hay surge como resultado da dimerização intermolecular do alcino, a sua formação poderia ser também diminuída caso este fosse mantido a uma concentração baixa. Nessas condições, o alcino acoplaria mais facilmente com o halogeneto de arilo do que consigo próprio, e portanto o rendimento do produto do acoplamento cruzado aumentaria.⁹⁶ Por outro lado, foi relatado que a adição lenta do acetileno e o uso de condições de transferência de fase têm constituído uma alternativa para diminuir o homo-acoplamento.⁹²

O rendimento do produto do acoplamento cruzado obtido depende também da estrutura e reactividade do halogeneto de arilo utilizado. Na presença de substituintes electroattractores, a velocidade do acoplamento cruzado é maior do que a reoxidação do Pd⁰. No entanto, quando estão presentes halogenetos ricos em electrões, a reacção do acoplamento cruzado é muito menor. Por isso, foi referido que devem ser utilizadas maiores quantidades do acetileno de modo a compensar a perda ocorrida devido ao homo-acoplamento. Isto explica a razão pela qual de entre os halogenetos de arilo, os iodetos são os que requerem condições mais suaves.⁹³

Por outro lado, foi também relatado que a utilização de solventes como o tetra-hidrofurano ou a dimetilformamida em vez da base (como solvente) tem como consequência o aumento da velocidade da reacção de acoplamento cruzado.⁹⁴ A escolha da amina também afecta o rendimento dos produtos do acoplamento de Sonogashira.⁹⁷

II.1.5.4 Acoplamento de Sonogashira-Hagihara em cumarinas

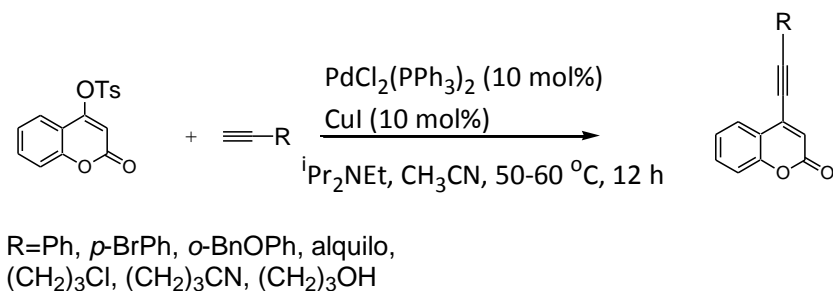
O primeiro acoplamento de um alcino a uma coumarina catalisado por paládio foi descrito por Mitra *et al*,⁹⁸ em 1998 ao obter a 3-(3-hidroxi-3-metilbut-1-inil)-cumarina (**39**) com um rendimento de 66% como produto da reacção de 3-bromocumarina (**40**) com 2-metilbut-3-in-2-ol em presença do sistema catalítico constituído por acetato de paládio, um ligando de fosfina terciário, a tri-*o*-tolilfosfina, iodeto de cobre e trietilamina a 120 °C, após 10 horas de reacção (Esquema II.1.15).



Esquema II.1.15 Acoplamento de Sonogashira da 3-bromo-cumarina (**40**) e do 2-metilbut-3-in-2-ol co-catalizado pelo cobre.

Foram também realizadas reacções de Sonogashira partindo da 4-tosilcumarina como electrófilo alternativo, tirando partido do carácter electroattractor do fragmento coumarina, o que diminui a densidade electrónica da ligação C-OSO₂ permitindo dessa forma a inserção do paládio.⁹⁹ Com o objectivo de avaliar a influência da estrutura dos acetilenos, foi feito um estudo da reacção da 4-tosilcumarina com uma série de acetilenos terminais com cadeias alifáticas e aromáticas, na presença de di-isopropilamina e de quantidades catalíticas de PdCl₂(PPh₃)₂ e de iodeto de cobre em acetonitrilo.

O estudo permitiu concluir que, todos os produtos do acoplamento de Sonogashira da 4-tosilcumarina (**41**) com os acetilenos escolhidos foram obtidos com rendimentos superiores a 70% em condições de temperatura compreendidas no intervalo de 50 a 60 °C e com um tempo inferior a 12 horas. De um modo geral, pode concluir-se que a natureza dos diferentes grupos substituintes usados não teve uma grande influência no valor dos rendimentos dos produtos obtidos (Esquema II.1.16).¹⁰⁰

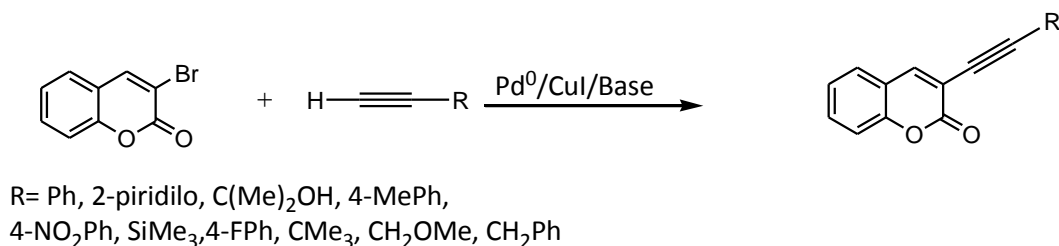


Esquema II.1.16 Acoplamento de Sonogashira da 4-tosilcumarina (**41**) com acetilenos com diferentes substituintes em presença do sistema catalítico constituído por PdCl₂(PPh₃)₂ e iodeto de cobre.¹⁰⁰

O efeito da estrutura das 4-tosilcumarinas na reactividade do acoplamento cruzado com 1-heptino foi também avaliado. Observou-se que a presença de diferentes substituintes no anel da coumarina não alterava significativamente a eficiência do acoplamento, com a excepção da 3-bromo-4-tosilcumarina.

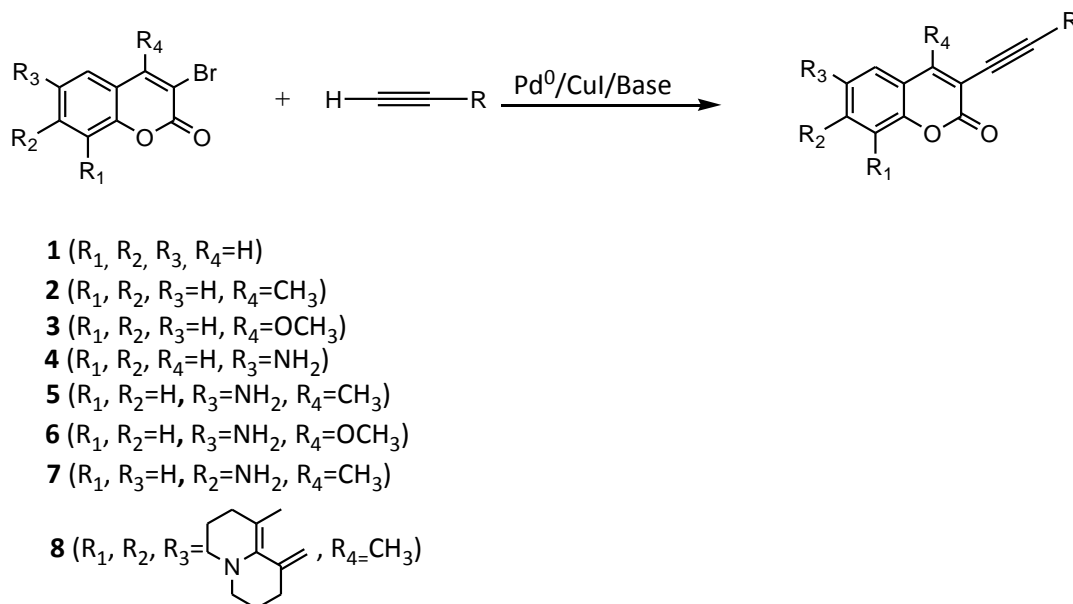
No âmbito da Química combinatória, Schiedel *et al.*¹⁰¹ desenvolveram métodos eficientes de síntese de produtos de acoplamentos cruzados catalisados por paládio e de “screening” de compostos fluorescentes com o objectivo de criar bibliotecas de compostos fluorescentes de modo a poder estabelecer a relação entre a estrutura e a actividade, com vista ao design racional de pigmentos à base de cumarinas.

Os compostos foram obtidos a partir das reacções de acoplamento cruzado de Suzuki, de Sonogashira-Hagihara e de Heck tendo sido introduzidos fragmentos arilo, etinileno e eteno. A primeira série de reacções de Sonogashira-Hagihara foi realizada por acoplamento da 3-bromocumarina (**40**) com diferentes acetilenos terminais usando como sistema catalítico $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]/CuI$ e originou etinilcumarinas com rendimentos de 74-95% (Esquema II.1.17).



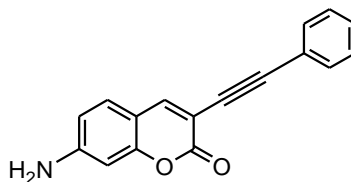
Esquema II.1.17 Estudo do acoplamento de Sonogashira co-catalizado com cobre partindo da 3-bromocumarina com acetilenos com diferentes substituintes.¹⁰¹

Com o objectivo de acrescentar as bibliotecas de espectros, foram então realizadas reacções de acoplamento cruzado com 3-bromocumarinas que possuíam grupos funcionais adicionais metilo, metoxilo e amina nas posições 4-, 6-, 7- e 8- (Esquema II.1.18).



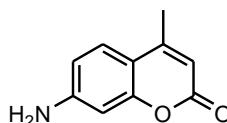
Esquema II.1.18 Estudo do acoplamento de Sonogashira co-catalizado com cobre partindo da 3-bromocumarina com grupos funcionais adicionais com acetilenos com diferentes substituintes.¹⁰²

Observou-se que os rendimentos deste conjunto de reacções eram diminutos por comparação com a reactividade da 3-bromo-cumarina (**40**), diminuindo quando o carácter doador de electrões dos substituintes aumentava.



(**42**)

De entre os compostos obtidos, a 3-feniletinil-7-amino-cumarina (**42**) apresentou o maior rendimento quântico ($\Phi_f=0,98$, $\lambda_{abs}=397$ nm, $\lambda_{em}=455$ nm em etanol) sendo inclusivamente maior do que a cumarina 120 (**43**) ($\Phi_f=0,88$, $\lambda_{abs}=354$ nm, $\lambda_{em}=435$ nm em etanol).



(**43**)

Com vista a possíveis aplicações destes compostos, os derivados NH_2 substituídos suscitam muito interesse devido à possibilidade de derivatização do grupo 7-amino.¹⁰¹

Capítulo II.2

**Síntese de cromóforos derivados de cumarinas com possíveis aplicações em
dispositivos fotovoltaicos**

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

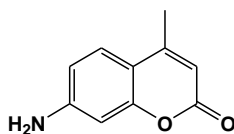
II.2

A síntese de sensibilizadores orgânicos com uma estrutura doador-ponte conjugada-aceitador (D- π -A) tem-se centrado na obtenção de corantes que possuam uma banda de absorção intensa e ampla na região do visível tirando partido da facilidade de modular as propriedades fotofísicas através da modificação estrutural.

Os espectros de absorção destes sensibilizadores orgânicos podem ser afinados dando particular atenção aos níveis de energia da HOMO e da LUMO os quais podem ser regulados através da variação do comprimento do sistema conjugado π e da capacidade electrodoadora do fragmento doador.¹⁰³

Nos corantes à base de cumarinas sabe-se que a foto-excitação induz uma transferência de carga intramolecular (ICT) do anel 1 para o anel 2. Esta transferência de carga pode ser modulada pela presença de diferentes substituintes químicos em ambos os anéis.

Para compreender a origem molecular das propriedades optoelectrónicas dos corantes à base de cumarinas e estabelecer quais os fragmentos requeridos para o *design* de sensibilizadores com uma eficiência elevada propôs-se a síntese de novos cromóforos derivados da 7-amino-4-metilcumarina (7-amino-4-metil-2H-cromen-2-ona) (**43**) por introdução de a) um grupo doador adicional no grupo amina da posição 7, b) dois grupos doadores adicionais no grupo amina da posição 7, c) um grupo doador adicional no grupo amina da posição 7 e um grupo electroattractor na posição 3, d) dois grupos doadores adicionais no grupo amina da posição 7 e um grupo electroattractor na posição 3 e avaliar as propriedades fotofísicas dos cromóforos obtidos.



(43)

A modificação estrutural pretendida com a introdução de um grupo doador adicional no grupo amina da posição 7 do composto **43** que deverá resultar numa diminuição da energia da LUMO e aumento da velocidade de injeção dos electrões, é promissora porque cria a possibilidade de ultrapassar os reduzidos tempos de vida de emissão (entre 0,9-3,5 ns) observados para os corantes

derivados das cumarinas. Por outro lado é gerada uma estrutura planar que desvia o espectro de absorção para a zona do vermelho.

Já a introdução de dois grupos aromáticos adicionais formando um fragmento de triarilamina electrodoador não planar evitaria a recombinação dos electrões e a agregação entre as moléculas. A introdução de um grupo alquilo doador adicional para além de um grupo aromático aumentaria a estabilidade à luz à semelhança das moléculas sintetizadas por Yum *et al.*¹⁰⁴

A introdução de um substituinte electroatractor na posição 3 permite não só desviar o espectro UV-Vis para a zona do vermelho mas também aumenta a eficiência da absorção de luz das cumarinas, quantificada pelo coeficiente de extinção molar, por facilitar a transferência de carga intramolecular.⁵³

II.2.1 Introdução de um grupo electrodoador adicional no grupo amina da posição 7

II.2.1.1 Síntese de 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (44) e de 4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (45)

De modo a introduzir um grupo doador adicional na posição 7 procedeu-se à reacção de Buchwald-Hartwig da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com o 4-iodoanisole. Para optimização das condições reaccionais foi realizado um estudo desta reacção em que se variou o número de equivalentes do 4-iodoanisole, a natureza e o número de equivalentes da base, a natureza e a percentagem molar do catalizador, a natureza e a percentagem molar do ligando e o processo de isolamento do produto da reacção. Este estudo permitiu a escolha das melhores condições reaccionais (Tabela II.2.1).

Quando se fez reagir a 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com 4-iodoanisole nas condições descritas por Driver e Hartwig⁷⁶ em presença de *ter*-butóxido de sódio, catalizada pelo sistema catalítico constituído por (DPPF)PdCl₂ e pela fosfina aromática quelante DPPF [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno] não foi obtida a 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) pretendida mas houve formação de uma mistura complexa de produtos (Tabela II.2.1, condição reaccional II.2.1).

A aplicação das condições reaccionais descritas por Wolfe e Buchwald⁷⁹ em que o *ter*-butóxido de sódio foi substituído por carbonato de cézio e o complexo catalítico utilizado era constituído por

Discussão de Resultados

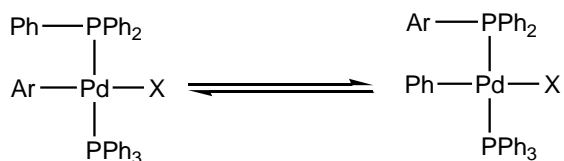
acetato de paládio e (\pm)-BINAP foram obtidas a 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) com um rendimento de 11% e a 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**) com um rendimento de 9% (Tabela II.2.1, condição reaccional 2).

Tabela II.2.1 Reacções de Buchwald-Hartwig da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com 4-iodoanisole usando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1 ^a	2 ^b	3 ^b	4 ^c	5 ^c	6 ^c
Nº equivalentes 4-iodoanisole	0,8	0,8	1,7	2	2	2
Base (nº eq)	NaO- <i>t</i> -Bu (1)	Cs ₂ CO ₃ (1,4)	Cs ₂ CO ₃ (2,8)	Cs ₂ CO ₃ (3)	Cs ₂ CO ₃ (3)	Cs ₂ CO ₃ (3)
Catalisador de Pd (mol %)	(DPPF)PdCl ₂ (4)	Pd(OAc) ₂ (10)	Pd(OAc) ₂ (20)	Pd(OAc) ₂ (10)	Pd(OAc) ₂ (4)	Pd(OAc) ₂ (4)
Ligando (mol %)	DPPF (12)	BINAP (15)	BINAP (7,8)	Xantphos (10)	Xantphos (4)	Xantphos (8)
Solvente	Dioxano	Dioxano	Dioxano	Dioxano	Dioxano	Dioxano
Temperatura(°C)	104	104	104	104	104	104
Tempo de reacção(h)	48	48	72	48	48	48
Resultado	Reacção incompleta	Reacção incompleta	Reacção incompleta	Reacção completa	Reacção incompleta	Reacção incompleta
Produtos 44/45 (η%)	-----	11/9	29/15	61/16	----	----

^a de acordo com a ref 76; ^b de acordo com a ref 79; ^c de acordo com a ref 89.

O ciclo catalítico proposto por Buchwald-Hartwig para a formação da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) está apresentado no esquema II.1.10. A formação de 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**) como produto secundário da reacção resulta de uma troca do grupo aromático proveniente do ligando no intermediário $\text{ArPd}^{\text{II}}(\text{PPh}_3)_2\text{X}$ (Eq. 1).⁷⁹ Goodson refere esta troca do grupo fenilo proveniente dos ligandos fosfina para os complexos de paládio formados após adição oxidativa e aponta como a melhor estratégia para diminuir esta reacção secundária proceder à reacção de acoplamento sem a presença de ligando.¹⁰⁵



Eq.1

Procedendo de seguida a uma reacção em que foram efectuadas modificações das condições referidas no trabalho de Soussi *et al.*⁸⁹ referentes ao número de equivalentes da base, às percentagens molares do catalizador e ligando e do método de isolamento dos produtos conduziram a que as melhores condições reaccionais são as referidas na Tabela II.2.1 (condição reaccional 4).

A reacção de Buchwald-Hartwig da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com o 4-iodoanisole (2eq.) utilizando como base o carbonato de cézio (3 eq.), como ligando o Xantphos (10 mol %) em presença do acetato de paládio (10 mol %) originou a 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) com um rendimento de 61%.

Este resultado vai de encontro ao trabalho de Audisio *et al.* que aponta o Xantphos como o ligando ideal a incluir num sistema catalítico com o Pd(OAc)₂ em presença de carbonato de cézio num protocolo versátil para a preparação de cumarinas *N*-substituídas.⁸⁹

Os ensaios posteriores efectuados e que se encontram referidos nas condições reaccionais 6 e 7 da Tabela II.2.1 tiveram como objectivo aumentar o rendimento e selectividade da reacção catalizada pelo sistema catalítico Pd(OAc)₂/Xantphos por diminuição da quantidade de catalizador e de ligando utilizados e por alteração da ordem de adição dos reagentes. De facto, tinha sido descrito que a formação da 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**) se devia ao uso de quantidades elevadas de catalizador e que a pré-mistura de ligando com o acetato de paládio na presença de carbonato de cézio resultava em velocidades de reacção ligeiramente superiores conduzindo por isso a rendimentos maiores.⁷⁹ Observou-se, no entanto, que nestas condições o grau de conversão era muito baixo. Foi também variado o método de isolamento dos dois produtos **44** e **45** por cromatografia de coluna tendo sido testadas como fases estacionárias a sílica gel e a alumina neutra e como fases móveis as misturas de hexano e acetato de etilo, éter de petróleo e acetato de etilo e clorofórmio. Os melhores resultados foram obtidos com clorofórmio.

Na Tabela II.2.2 resumem-se os dados espectroscópicos de ^1H RMN, ^{13}C RMN, IV e MS de 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) e da 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**).

O espectro de massa da estrutura **44** apresenta um sinal correspondente ao ião molecular $[\text{M}]^+$ a m/z 281 u.m.a. com mais 106 u.m.a. do que o sinal do ião molecular do material de partida o que sugere a presença de um grupo anisole adicional na molécula. A fragmentação da molécula dá origem a um ião de massa m/z 266 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ correspondente ao pico base. A clivagem posterior com extrusão do grupo carbonilo é muito característica das cumarinas e leva ao ião de massa m/z 238 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$.

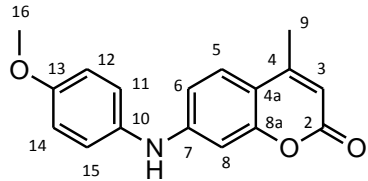
O espectro de ^1H RMN da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) difere do espectro da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) pela presença de três sinais adicionais: um singuleto a δ 3,85 ppm (3H, *s*) referente ao grupo OCH_3 -16, um duplete a δ 7,17 ppm (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz) que corresponde à sobreposição dos sinais dos prótons aromáticos H-11 e H-15 e um duplete a δ 6,93 ppm (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz) que corresponde à sobreposição dos sinais dos restantes prótons aromáticos H-12 e H-14 do anel adicional. O sinal referente aos prótons H-12 e H-14 que se encontram em posição *orto* relativamente ao grupo OCH_3 surge a campo mais alto devido ao efeito de blindagem deste grupo electrodoador.

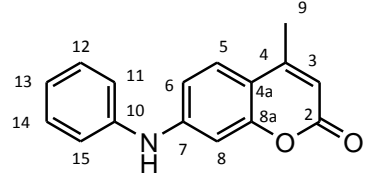
O espectro de ^{13}C RMN da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) apresenta cinco sinais adicionais: um a δ 55,5 ppm de um carbono sp^3 correspondente ao metoxilo em C-16, dois a δ 114,8 ppm e a δ 124,3 ppm que correspondem aos átomos de carbono C-11, C-15 e C-12 e C-14 respectivamente, e dois sinais a δ 149,5 ppm e 155,5 ppm referentes aos átomos de carbono quaternários C-10 e C-13.¹⁰⁶ Tal como se observou no espectro de próton, os sinais dos carbonos *orto* relativamente ao grupo metoxilo surgem a valores de desvios químicos menores.

No espectro de ^1H RMN observam-se ainda três sinais na região dos prótons aromáticos, a δ 7,40 ppm (1H, *d*, $J_{5,6} = 8,0$ Hz), a δ 6,75 ppm (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,0$ Hz) e δ 6,76 ppm (1H, *s*) que correspondem aos três prótons aromáticos H-5, H-6 e H-8, respectivamente. No espectro de ^{13}C RMN existem seis sinais devidos ao anel aromático a valores de δ 110,2, 125,8, 111,3, 149,5, 100,3 e 156,7 ppm os quais correspondem aos átomos de carbono C-4A, C-5, C-6, C-7, C-8 e C-8A, respectivamente.

Discussão de Resultados

Tabela II.2.2 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (filme) e de MS (EI+) para 7-(metoxifenilamino)-4-metilcumarina (**44**) e para a 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**).

<div style="text-align: center;">  <p>(44)</p> </div>				
C	δ_{C} (CDCl_3)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (CDCl_3)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme, cm^{-1})	EM-IE m/z (int. rel.,%)
2	162,0	----	3302 (NH)	281 (84)
3	111,9	6,04 (1H, s/l)	2923 (CH)	266 (100)
4	152,5	----	2852 (CH)	253 (6)
4a	110,2	----	1704 (C=O)	238(20)
5	125,8	7,40 (1H, dl, $J_{5,6} = 8,0$ Hz)	1620 (C=C)	
6	111,3	6,75 (1H, dl, $J_{6,5} = 8,0$ Hz)	1170 (C-O)	
7	149,5	----		
8	100,3	6,76 (1 H, s/l)		
8a	156,7	----		
9	18,5	2,38 (3H, s/l)		
10	132,9	----		
11	124,3	7,17 (2H, d, $J_{11,12} = 8,0$ Hz)		
12	114,8	6,93 (2H, d, $J_{12,11} = 8,0$ Hz)		
13	155,5	----		
14	114,8	6,93 (2H, d, $J_{14,15} = 8,0$ Hz)		
15	124,3	7,17 (2H, d, $J_{15,14} = 8,0$ Hz)		
16	55,5	3,85 (3H, s/l)		

<div style="text-align: center;">  <p>(45)</p> </div>				
C	δ_{C} (CDCl_3)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (CDCl_3)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme, cm^{-1})	EM-IE m/z (int. rel.,%)
2	161,6	----	3304 (NH)	251(100)
3	112,3	6,08(1H, s/l)	2923 (CH)	223 (83)
4	152,4	----	2853 (CH)	194 (18)
4a	112,7	----	1704 (C=O)	
5	125,6	7,44 (1H, dl, $J_{5,6} = 8,0$ Hz)	1163 (C-O)	
6	110,8	6,92 (1H, dl, $J_{6,5} = 8,0$ Hz)	1630 (C=C)	
7	140,3	----		
8	101,7	6,98 (1 H, s/l)		
8a	155,6	----		
9	18,5	2,39 (3H, s/l)		
10	147,5	----		
11	120,7	7,21 (1H, d, $J_{11,12} = 8,0$ Hz)		
12	129,5	7,37 (1H, d, $J_{12,11} = 8,0$ Hz)		
13	123,6	7,11 (1H, t, $J = 8,0$ Hz)		
14	129,5	7,37 (1H, d, $J_{14,15} = 8,0$ Hz)		
15	120,7	7,21 (H, d, $J_{15,14} = 8,0$ Hz)		

A existência de uma lactona α,β -insaturada na molécula é evidenciada pela banda, no espectro no infravermelho, a 1704 cm^{-1} devida às vibrações de alongamento (C=O) da lactona, de uma banda a 1170 cm^{-1} devida à vibração de deformação (C-O) e confirmada pelos sinais, no espectro de carbono, a δ 162,0, 111,9 e 152,5 ppm correspondentes ao carbonilo em C-2 e aos carbonos da ligação dupla C-3 e C-4, respectivamente. A presença de um grupo metilo em C-9 foi evidenciada pelo sinal a δ 2,38 ppm que integra para três prótons e confirmada pelo sinal, no espectro de ^{13}C RMN, a δ 17,9 ppm.

Comparativamente, o espectro de GC-TOF EIMS do composto **45** apresenta um sinal correspondente ao íão molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 251 u.m.a. com mais 75 u.m.a. do que o sinal do íão molecular do material de partida o que sugere a presença de um grupo fenilo adicional na molécula. A presença do grupo fenilo foi confirmada nos espectros de ^1H RMN e de ^{13}C RMN. Assim, observam-se, no espectro de ^1H RMN, dois dupletos a δ 7,21 ppm (2H, d , $J = 8,0\text{ Hz}$) e a δ 7,37 (2H, d , $J = 8,0\text{ Hz}$) que correspondem aos quatro prótons H-11, H-15 e H-12, H-14, respectivamente. Existe ainda um tripleto adicional a δ 7,11 ppm atribuível ao próton aromático H-13.

Existem, no espectro de ^{13}C RMN, três sinais adicionais a δ 120,7 ppm, δ 123,6 ppm e a δ 129,5 ppm que correspondem aos átomos de carbono C-11 e C-15, C-13, C-12 e C-14, respectivamente e vêm confirmar a existência de um grupo aromático adicional.

II.2.2. Introdução de dois grupos electrodoadores adicionais no grupo amina na posição 7

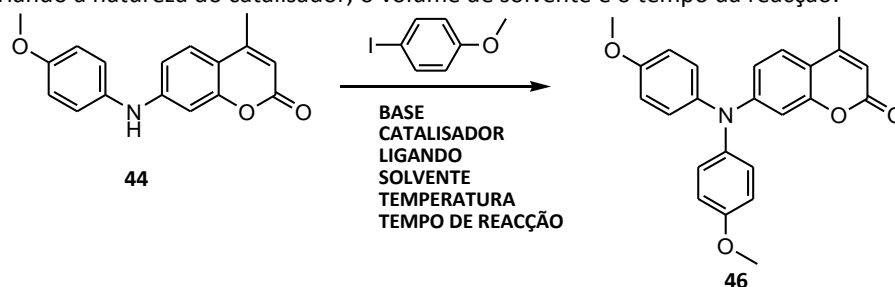
II.2.2.1. Estratégia de síntese de 7-(bis(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**46**)

A reacção seguinte teve como objectivo a introdução de um segundo grupo doador aromático adicional. Na Tabela II.2.3 estão resumidas as condições reaccionais testadas nos diferentes ensaios realizados.

Inicialmente a reacção da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) com 4-iodoanisol (2 eq.) nas condições reaccionais descritas na entrada 5 da tabela II.2.1, i.e. em presença de carbonato de cézio (3 eq.) catalizada pelo sistema constituído por acetato de paládio (10 mol%) e o ligando Xantphos (10 mol%) não resultou, mantendo-se o material de partida inalterado.

Um tempo de reacção mais prolongado e um volume de solvente utilizado mais diminuto não provocaram o aumento da conversão do material de partida. Por outro lado, a substituição do catalizador de paládio por PdCl_2 ou $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ o qual, de acordo com Wolfe e Buchwald pode ser utilizado como alternativa ao acetato de paládio,⁷⁹ não conduziu à formação do produto.

Tabela II.2.3 Reacções de Buchwald-Hartwig da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**44**) com 4-iodoanisole variando a natureza do catalisador, o volume de solvente e o tempo da reacção.

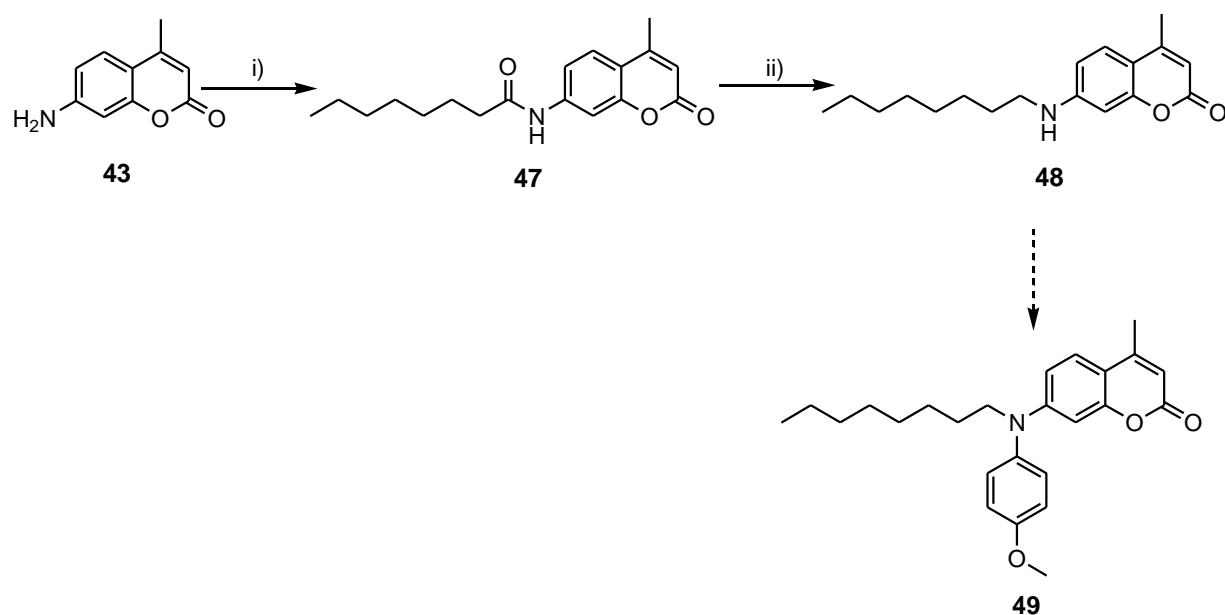


Condições reaccionais	1 ^a	2	3	4
Nº de equivalentes de iodoanisole	2	2	2	2
Base (nº eq)	Cs_2CO_3 (3)	Cs_2CO_3 (3)	Cs_2CO_3 (3)	Cs_2CO_3 (3)
Catalisador de Pd (mol %)	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10)	PdCl_2 (10)	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (10)	$\text{Pd}_2(\text{OAc})_2$ (10)
Ligando (mol %)	Xantphos (10)	Xantphos (10)	Xantphos (10)	Xantphos (10)
Solvente	Dioxano	Dioxano	Dioxano	Dioxano (quantidade mínima)
Temperatura (°C)	104	104	104	104
Tempo de reacção (h)	48	72	72	72
Resultado	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto

^a de acordo com a ref 79.

II.2.2.2. Estratégia de síntese de 7-((4-metoxifenil)(octil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**49**)

De modo a conseguir introduzir um grupo doador aromático e uma cadeia alquílica de cadeia longa, pretendeu-se proceder à acilação da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) seguida da redução da amida resultante e por último à reacção de acoplamento de Buchwald-Hartwig na qual é introduzido o segundo grupo doador aromático (Esquema II.2.1).



i) $C_7H_{15}COCl$ (3 eq.), piridina (3 eq.), dioxano, t. amb.; ii) $LiAlH_4$ ou BH_3 , tetra-hidrofurano, t. amb.

Esquema II.2.1 Estratégia de síntese de 7-((4-metoxifenil)(octil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**49**).

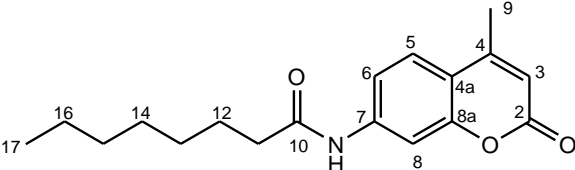
A acilação da 7-amino-4-metilcumarina (**43**), com cloreto de octanoílo e piridina em dioxano, em atmosfera inerte à temperatura ambiente originou, ao fim de uma hora, a N-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**47**) com um rendimento de 83%.

As atribuições dos sinais dos espectros de 1H RMN e de ^{13}C RMN do composto **47** foram feitas com base nas técnicas de DEPT, HMQC e HMBC e encontram-se agrupados na Tabela II.2.4.

O espectro de massa GC-TOF EIMS de **47** apresenta um sinal que corresponde a $[M]^+$ a m/z 301 u.m.a.. A fragmentação da molécula com a extrusão do fragmento acilo origina um ião de massa m/z 175 $[M-C_8H_{14}O]^+$, correspondente ao pico base.

Discussão de Resultados

Tabela II.2.4 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (KBr) e de MS (EI+) para a *N*-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**47**).

					
C	δ_{C} (DMSO)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (DMSO)	HMBC (DMSO) (^1H - ^{13}C)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr, cm^{-1})	TOF MS EI+m/z (int. rel.,%)
2	160,0	----	----	3294 (NH)	301 (25)
3	112,0	6,23 (<i>sl</i> , H-3)	C ₂ , C _{4a} , C ₉	2953 (CH)	217 (11)
4	153,0	----	----	2918 (CH)	175 (100)
4a	114,7	----	----	2870 (CH)	147 (79)
5	125,8	7,68 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)	C ₄ , C ₆	2851 (CH)	
6	115,0	7,46 (<i>dl</i> , $J = 8,4$ Hz)	C ₈	1718 (C=O)	
7	142,7	----	----	1688 (C=O)	
8	105,4	7,75 (<i>sl</i>)	C ₆ , C ₇ , C _{8a}	1588 (C=C)	
8a	153,6	----	----	1528 (C=C)	
9	17,9	2,38 (<i>sl</i>)	C ₄ , C _{4a}	1466 (C=C)	
10	172,0	----	----	1173 (C-O)	
11	36,5	2,34 (<i>t</i> , $J = 7,3$ Hz)	C ₁₀ , C ₁₂ , C ₁₃		
12	24,8	1,58 (<i>m</i>)	C ₁₁ , C ₁₃		
13	28,4*				
14	28,5*				
15	31,1	1,26 (8H, <i>m</i>)			
16	22,0				
17	13,9	0,84 (<i>m</i>)	C ₁₅ , C ₁₆		
NH	---	10,29 (1H, <i>s</i>)	C ₆ , C ₇ , C ₈ , C ₁₀		

*Sinais permutáveis

A presença de um grupo amida no composto **47** foi evidenciada pela presença de um sinal, no espectro de próton em DMSO, a δ 10,3 ppm que integra para um próton e de um sinal adicional a δ 172,0 ppm correspondente ao átomo de carbono do carbonilo em C-10 no espectro de ^{13}C RMN. A presença deste grupo foi confirmada pela presença de duas bandas de absorção, no espectro no infravermelho, a 1688 cm^{-1} devida às vibrações de alongamento (C=O) da amida e a 3294 cm^{-1} atribuível às vibrações de alongamento (NH).

No espectro de ^1H RMN observam-se ainda quatro sinais adicionais devidos aos quinze prótons da cadeia da octanamida: um singuleto a δ 0,84 ppm que integra para três prótons e corresponde ao grupo metilo em C-17, um multipletto a δ 1,26 ppm que integra para oito prótons e corresponde à sobreposição dos sinais dos grupos metileno (CH₂-13, CH₂-14, CH₂-15 e CH₂-16), um multipletto a δ 1,58 ppm que integra para dois prótons referente ao grupo CH₂-12 e um triplete a δ 2,34 ppm que integra para dois prótons e que se refere ao metileno adjacente ao grupo carbonilo da amida CH₂-11. Este sinal encontra-se correlacionado a longa distância com o sinal referente ao átomo do carbonilo em C-10 a δ

172,0 ppm. Os sinais dos prótons da octanamida correspondem (por HMQC e por HMBC) aos sinais dos carbonos a δ 13,9 ppm (CH₃-17), a δ 22,0 ppm (CH₂-16), δ 24,8 ppm (CH₂-12), a δ 28,4 ppm (CH₂-13), a δ 28,5 ppm (CH₂-14), a δ 31,1 ppm (CH₂-15) e a δ 36,5 ppm (CH₂-11), respectivamente. A presença de uma cadeia carbonada na molécula de *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) foi confirmada no espectro no infravermelho pelas bandas de absorção a 2953, a 2918, a 2870 e a 2851 cm⁻¹, devidas às vibrações de deformação (C-H) axiais simétrica e assimétrica dos grupos metilo e metileno.

No espectro de ¹H RMN observam-se ainda três sinais na região dos prótons aromáticos, a δ 7,68 (1H, *d*, $J_{5,6} = 8,4$ Hz), a δ 7,46 ppm (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,8$ Hz) e δ 7,75 ppm (1H, *sl*) que correspondem aos três prótons aromáticos H-5, H-6 e H-8, respectivamente. Os sinais dos prótons *orto* ao grupo amina, H-6 e H-8 surgem desviados de δ 6,64 ppm para δ 7,46 ppm e de δ 6,49 ppm para δ 7,75 ppm, o que pode ser explicado pela desblindagem dos prótons resultante do efeito anisotrópico provocado pelo grupo carbonilo. Os sinais dos prótons aromáticos acima referidos estão correlacionados por HMQC com os sinais dos metinos aromáticos a δ 125,8 ppm, 115,0 ppm e 105,4 ppm.

A presença de uma lactona α,β -insaturada é evidenciada pela existência, no espectro no infravermelho, de uma banda a 1718 cm⁻¹ devida às vibrações de alongamento (C=O) da lactona, de uma banda a 1183 cm⁻¹ devida à vibração de deformação (C-O) e confirmada pelo sinal a δ 160 ppm correspondente ao carbonilo em C-2, no espectro ¹³C RMN.

A presença de um grupo metilo em C-9 foi evidenciada pelo sinal a δ 2,38 ppm que integra para três prótons e está correlacionado por HMQC com o sinal a δ 17,9 ppm. Observa-se ainda um singuleto largo a δ 6,23 ppm atribuível ao próton H-3, característico da 4-metilcoumarina, o qual corresponde por HMQC ao sinal do metino a δ 111,6 ppm. Esta atribuição foi confirmada pelas correlações a longa distância observadas entre o sinal deste próton e os sinais dos átomos de carbono do grupo metilo CH₃-9 e do carbonilo em C-2.

O mecanismo da reacção de acilação é um mecanismo de substituição nucleofílica e encontra-se esquematizado na Figura II.2.1.

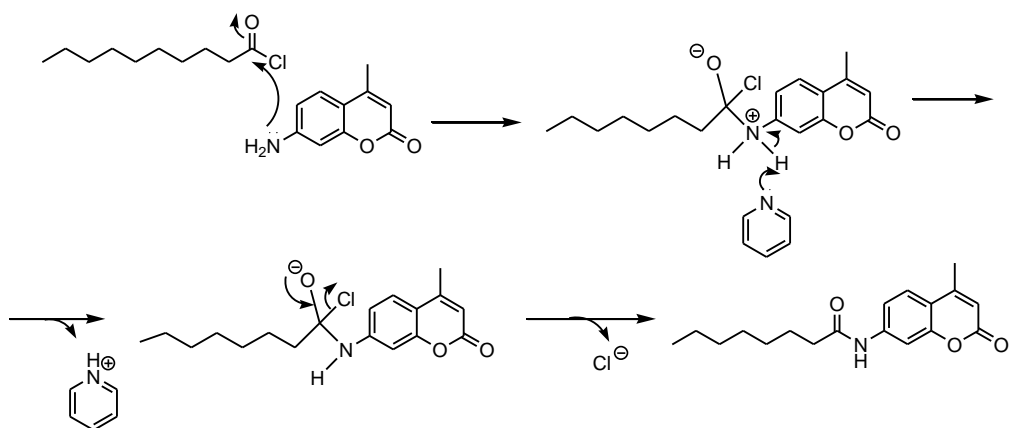
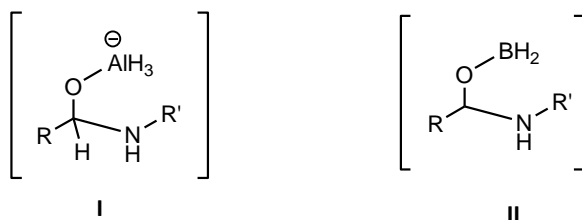


Figura II.2.1-Mecanismo da reacção de acilação.

Ocorre o ataque do azoto nucleófilo ao carbonilo do cloreto de ácido com a formação de um intermediário tetraédrico o qual regressa à estrutura trigonal plana após a saída do anião cloreto (grupo de saída). A piridina remove o protão da amina quando esta ataca o cloreto de ácido, formando em presença do anião cloreto a espécie cloridrato de piridina.

Poder-se-á também considerar a hipótese de ocorrer uma catálise nucleofílica pela piridina desta reacção concorrente.

Com o objectivo de sintetizar a 4-metil-7-(octilamino)-2H-cromen-2-ona (**48**) procedeu-se à redução do composto utilizando como agentes redutores ou hidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4) e borano (BH_3) que constitui uma boa alternativa pois apresenta uma quimiosselectividade ligeiramente diferente.¹⁰⁷ Em ambas as reacções o mecanismo envolve a formação de um intermediário tetraédrico (I ou II) o qual colapsa para formar um ião imínio que é reduzido de novo por transferência de hidreto para dar a amina correspondente.



A análise das placas de TLC das reacções realizadas permitiu concluir que, apesar da reacção com o redutor BH_3 ter sido mais extensa, houve formação de misturas complexas em ambas as reacções o

que sugere a formação dos produtos da clivagem da amida (Figura II.2.2): o aldeído, o álcool resultante da redução do aldeído em presença de excesso do agente redutor e a amina primária (Figura II.2.2), apesar de não ter sido efectuado o isolamento dos componentes da mistura.

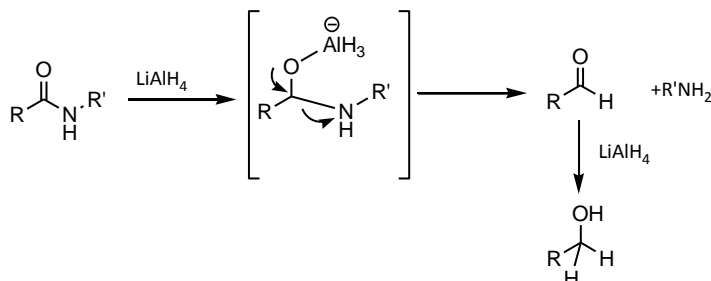
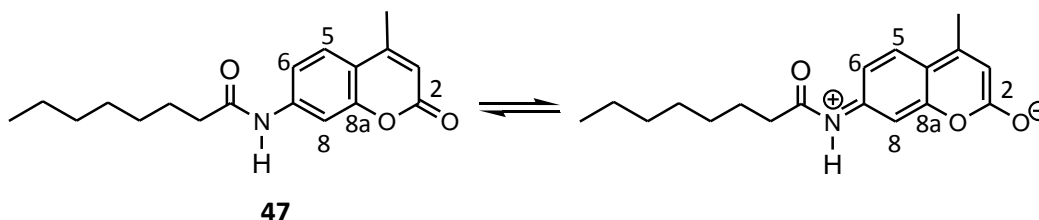


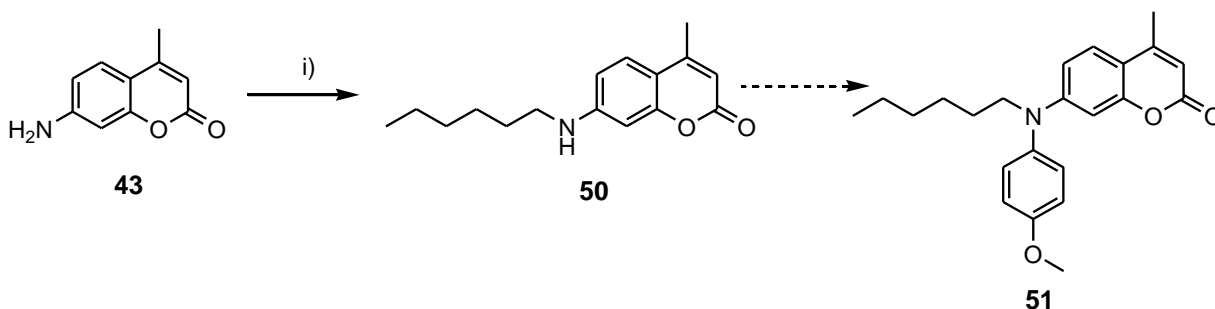
Figura II.2.2- Mecanismo da clivagem redutiva da amida¹⁰⁸

A presença do grupo carbonilo electroatractor em C-2 na *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) exerce um efeito de deslocalização da carga electrónica do anel aromático, por ressonância, o qual resulta num enfraquecimento da ligação C-N da amida e favorece a formação dos produtos da clivagem redutiva como alternativa à redução da amida à semelhança do que foi observado na redução de amidas aromáticas substituídas com grupos electroattractores.¹⁰⁸



II.2.2.3. Estratégia de síntese de (7-(hexil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**51**)

Procedeu-se à reacção de aminação redutiva da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com hexanal em presença de ácido acético glacial e de seguida do agente redutor cianoboro-hidreto de sódio que deu origem à formação de uma mistura complexa (Esquema II.2.2).¹⁰⁹



i) $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{CHO}$ (1,3 eq.), CH_3COOH glacial, EtOH; NaCNBH_3 (4 eq.).

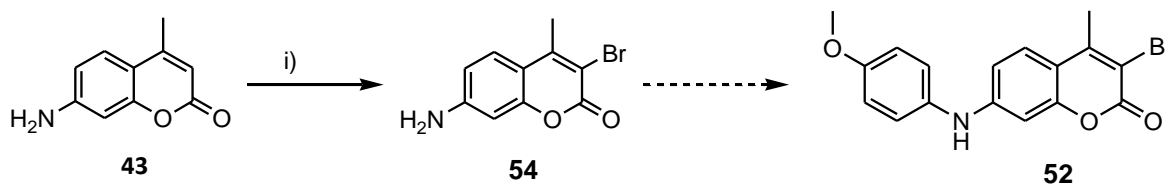
Esquema II.2.2 Estratégia de síntese de (7-(hexil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (51).

Foi realizado um ensaio posterior em que a redução foi efectuada com boro-hidreto de sódio mas não se observou a formação do composto 50.

II.2.3. Introdução de um grupo electrodoador adicional no grupo amina da posição 7 e de um grupo electroattractor na posição 3

II.2.3.1. Síntese de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (52) e de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (53)

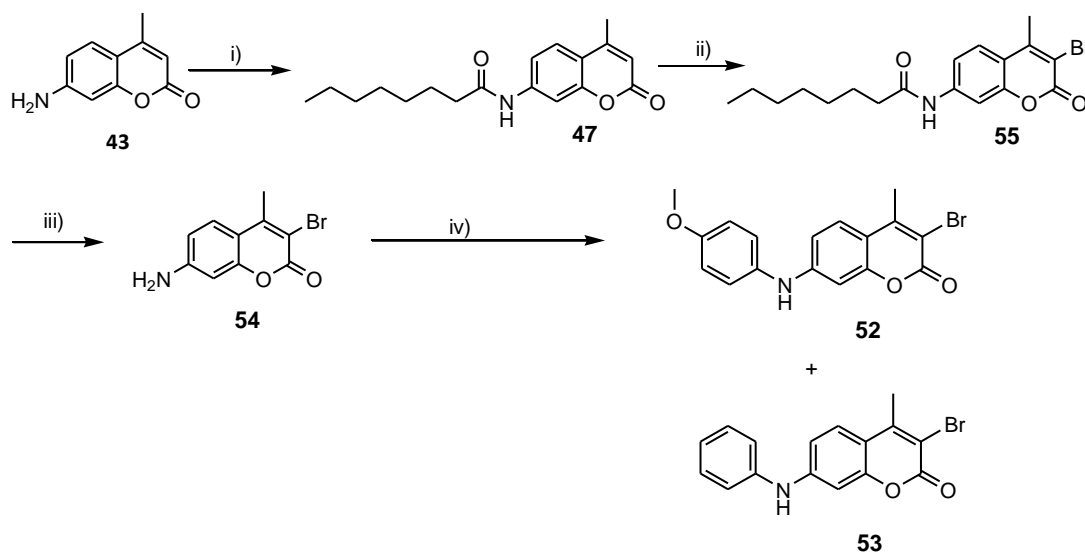
Para introduzir um grupo electroattractor na posição 3 do anel da 7-amino-4-metilcumarina procedeu-se à bromação da 7-amino-4-metil-2H-cromen-2-ona (43) nas condições descritas por Avó *et al.*¹¹⁰ com brometo de hidrogénio, em presença de oxone e seguida da adição de trietilamina a qual resultou na formação de uma mistura complexa o que sugere que nestas condições, a bromação não foi selectiva. Este resultado não é surpreendente tendo em atenção a activação do anel A da cumarina pelo grupo amina.



i) Oxone (1,5 eq.), HBr 2M (2,8 eq.), NEt_3 (3 eq.), CH_2Cl_2 , t. amb.

Esquema II.2.3 Estratégia de síntese de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (52)

A bromação selectiva na posição 3 foi conseguida procedendo inicialmente à acilação da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com cloreto de octanoílo e piridina em dioxano, em atmosfera inerte à temperatura ambiente. De seguida, a bromação da *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) com bromo em clorofórmio, seguida da adição de trietilamina, originou a *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) com um rendimento de 85% (Esquema II.2.4).¹¹¹



i) $C_7H_{15}COCl$ (3 eq.), piridina (3 eq.), dioxano, ii) Br_2 (1,3 eq.), NEt_3 (4,8 eq.), $CHCl_3$; iii) H_2SO_4 (10%), dioxano; iv) condições descritas na tabela II.2.5.

Esquema II.2.4 Estratégia alternativa de síntese de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**52**).

As atribuições dos sinais do espectro de 1H RMN e de ^{13}C RMN do composto **55** foram feitas com base nas técnicas de DEPT, HMQC e HMBC e por comparação com os dados espectroscópicos do composto (**47**) (Tabela II.2.4).

No espectro de massa GC-TOF EIMS de **55** observa-se um sinal intenso que corresponde a $[M+H]^+$ a m/z 380/382 u.m.a., numa razão de $\sim 1:1$, o que confirma a presença de um átomo de bromo na estrutura. A fragmentação da molécula origina um ião de massa m/z 301 u.m.a. $[M-Br]^+$ correspondente à perda de um átomo de bromo.

O espectro de ^1H RMN da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) difere do da *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) pelo desaparecimento do singuleto largo a δ 6,23 ppm atribuível ao próton H-3.

Por outro lado, no espectro de ^{13}C RMN de **55**, o sinal do átomo de carbono C-3, agora ligado ao átomo de bromo, surge a campo mais alto (a δ 109,5 ppm) pois está sujeito ao “efeito de átomo pesado” no qual o efeito de blindagem diamagnética devido à presença dos electrões no átomo de bromo é superior ao efeito indutivo.¹¹² A atribuição do sinal do átomo de carbono C-3 foi confirmada pela correlação a longa distância observada com os prótons do metilo em C-9 e pela proximidade do valor estimado do desvio químico dos carbonos sp^2 da ligação dupla tendo em conta a presença do grupo metilo em C-9 e do átomo de bromo em C-3.¹¹³

A reacção de bromação ocorre por um mecanismo de adição electrófila em que um dos extremos de uma molécula de bromo fica polarizado positivamente devido à repulsão electrónica pelos electrões π da ligação dupla a qual se encontra activada pela presença de um grupo metilo na posição 4. Ocorre então a formação de um ião bromónio cíclico. De seguida ocorre a abertura do anel do ião bromónio com a formação de um carbocátion terciário e benzílico e a regeneração da ligação dupla desencadeada pela formação de HBr o qual é armadilhado pela trietilamina.

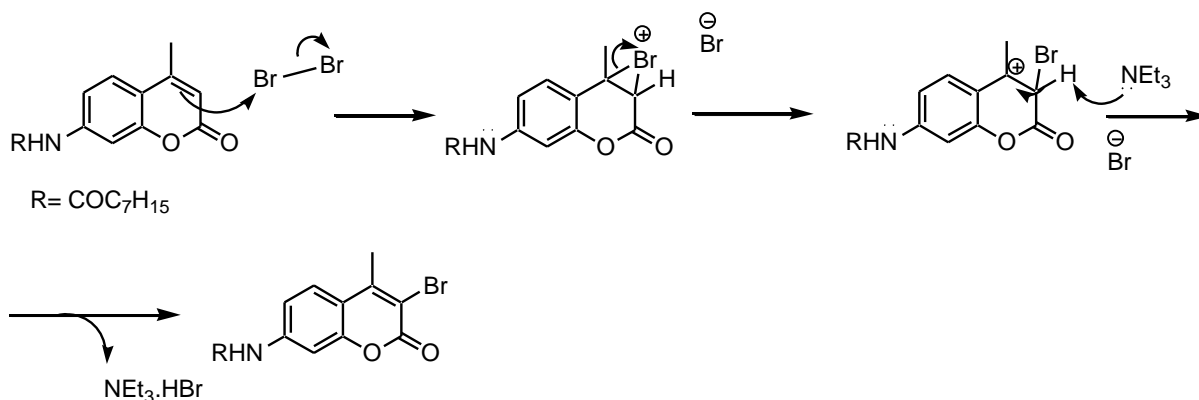


Figura II.2.3 Mecanismo da reacção de bromação.

A hidrólise de *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) em dioxano usando uma solução de ácido sulfúrico a 10% a refluxo, originou a 7-amino-3-bromo-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) com um rendimento de 66%.

O espectro de ^1H RMN em dimetilsulfóxido da 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) difere do da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**55**) pelo desaparecimento dos quatro sinais correspondentes aos quinze prótons da cadeia da octanamida e pelo desvio do sinal do grupo amina em C-7 para campo mais alto surgindo a δ 6,25 ppm e que integra para dois prótons. A presença de uma amina primária na molécula foi confirmada pela presença, no espectro no infravermelho, de duas bandas a 3456 cm^{-1} e 3359 cm^{-1} originada pelas vibrações de alongamento (N-H) simétrica e assimétrica.

A hidrólise da octanamida foi também confirmada pelo desaparecimento do sinal do carbonilo em C-10 que surgia, no espectro de ^{13}C RMN do composto **55** a δ 172,1 ppm e dos sete sinais a campo alto referentes aos átomos de carbono da cadeia da octanamida.

O passo seguinte teve como objectivo a introdução de um grupo anisole electrodoador na posição 7 da 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) catalizada pelo cobre (acoplamento de Ullmann). A aplicação das condições reaccionais utilizadas por Kelkar e colaboradores,¹¹⁴ para a síntese de triarilaminas *i.e* a reacção da 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) com o 4-iodoanisole em 1,2-diclorobenzene utilizando, como base o *ter*-butóxido de potássio, como catalizador o iodeto de cobre e 1,10-fenantrolina como ligando quelante não resultou, mantendo-se o material de partida inalterado (Tabela II.2.5, condição reaccional 1).

Testaram-se também as condições de acoplamento de Ullmann referidas pelo trabalho de Choi e colaboradores¹¹⁵ o qual refere a síntese de corantes derivados de cumarinas que possuem como grupos doadores [bis(9,9-dimetilfluoren-2-il)amino]-4-metil-2H-cromen-2-ona por reacção da 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) com 2-iodo-9,9-dimetil-fluoreno em 1,2-diclorobenzene, em presença de carbonato de potássio, utilizando como catalizador cobre e como ligando de éter de coroa. Não se observou a formação do produto (Tabela II.2.5, condição reaccional 2).

Como alternativa procedeu-se à reacção de Buchwald-Hartwig da 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) com 4-iodoanisole. A reacção realizada de acordo com as condições referidas por Gigante *et al.*¹¹⁶ em presença de *ter*-butóxido de sódio catalizada pelo sistema catalítico constituído por acetato de paládio e pelo ligando tri-*ter*butilfosfina em *o*-xileno também não conduziu à formação do produto pretendido.

Discussão de Resultados

A reacção de Buchwald-Hartwig da 7-amino-3-bromo-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) com o 4-iodoanisole (2 eq.) na condição reaccional 4 da tabela II.2.1 i.e. utilizando como base o carbonato de cézio (3 eq.), como ligando o Xantphos (10 mol %) em presença do acetato de paládio (10 mol %) originou a 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**52**) com um rendimento de 25% e de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**) com um rendimento de 22%. À semelhança do que se observou anteriormente, a formação de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**) resulta da permuta do grupo aromático do ligando no intermediário $\text{ArPd}^{\text{II}}(\text{PPh}_3)_2\text{X}$ (Eq. 1).

Tabela II.2.5 Reacções de acoplamento da 7-amino-3-bromo-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) com 4-iodoanisole utilizando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4	5	6
Nº equivalentes 4-iodoanisole	3	3	1,1	2	----	2
Nº equivalentes iodobenzene	----	----	----	----	2	----
Base (nº eq)	KO- <i>t</i> -Bu (3)	K ₂ CO ₃ (3)	KO- <i>t</i> -Bu (1,1)	Cs ₂ CO ₃ (3)	Cs ₂ CO ₃ (3)	Cs ₂ CO ₃ (3)
Cat. de Cu/Pd (mol %/ nº eq)	CuI (11 mol%)	Cu (3 eq)	Pd(OAc) ₂ 2,5 mol%	Pd(OAc) ₂ (10 mol%)	Pd(Fe ₃ O ₄) (19 mg)	Pd(Fe ₃ O ₄) (84 mg)
Ligando (mol %/ nº eq)	1,10-fenantrolina (11 mol%)	18-crown-6 (0,3 eq)	P(<i>t</i> -Bu) ₃ (10 mol%)	Xantphos (10 mol%)	Xantphos (5 mol%)	Xantphos (5 mol%)
Solvente	1,2-C ₆ H ₄ Cl ₂	1,2-C ₆ H ₄ Cl ₂	<i>o</i> -xileno	Dioxano	Dioxano	Dioxano
Temperatura (°C)	180	180	120	104	104	104
Tempo de reacção (h)	48	48	48	120	144	192
Resultado	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto	Mistura complexa	Reacção completa	Reacção incompleta	Reacção incompleta
Produtos 52/53 (η%)	----	----	----	25/22	--/64	9/10

^a de acordo com a ref 114; ^b de acordo com a ref 115; ^c de acordo com a ref 116.

Alternativamente e recorrendo-se a um catalizador em que o paládio se encontra adsorvido a nanopartículas de ferrite (Fe₃O₄), Pd(Fe₃O₄), procedeu-se à reacção de 7-amino-3-bromo-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) com o iodobenzene usando Xantphos como ligando. Este tipo de catalizador

apresenta as vantagens de um catalisador homogéneo, nomeadamente uma actividade e seletividade elevada e simultaneamente as vantagens de um catalisador heterogéneo, i.e., a facilidade de separação (com a ajuda de um imã seguida de decantação do meio reaccional) e a possibilidade de reutilização.¹¹⁷ Apesar de terem sido observados tempos de reacção mais elevados, a reacção na condição reaccional 5 da tabela 5 originou a 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**) com um rendimento elevado (64%).

Já a aplicação deste catalisador de Pd(Fe₃O₄) na reacção de anisole com 7-amino-3-bromo-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) resultou num grau de conversão global muito mais baixo do que o ensaio com o iodobenzeno apesar do tempo de reacção mais elevado, o que pode ser explicado pelo facto do 4-iodoanisole ser um halogeneto de arilo mais rico em electrões do que o iodobenzeno o que dificulta o passo inicial da reacção de adição oxidativa da espécie catalítica de Pd na ligação C-I.

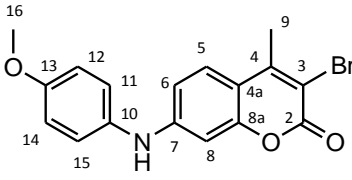
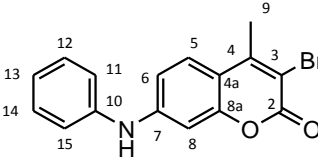
Na tabela II.2.6 encontram-se resumidos os dados espectroscópicos de ¹H RMN, ¹³C RMN, IV e MS de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) e de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**).

O espectro de massa do composto **52** apresenta um sinal a *m/z* 281 que se verificou não corresponder ao ião molecular da estrutura **52**. Este sinal resulta da perda de um átomo de bromo no ião molecular [(M+H)-Br]⁺. O espectro possui um modelo de fragmentação análogo ao descrito para a 7-(metoxifenilamino)-4-metilcumarina (**44**) apresentando iões fragmento a *m/z* 266 [(M+H)-Br-CH₃]⁺, a *m/z* 251 [(M+H)-Br-OCH₃+H]⁺ e a *m/z* 238 [(M+H)-Br-CH₃-CO]⁺.

O espectro de ¹H RMN da 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**52**) em clorofórmio deuterado difere do espectro de ¹H RMN da 7-amino-3-bromo-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**54**) pelo aparecimento de um singuleto a δ 3,85 ppm (3H, *s*) que corresponde ao grupo metoxilo OCH₃-16, de um duplete a δ 6,94 ppm (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz) referente à sobreposição dos sinais dos prótons aromáticos H-12 e H-14 e de um duplete a δ 7,17 (2H, *d*, *J*=8,3 Hz) devido à sobreposição dos sinais dos prótons H-11 e H-15.

Discussão de Resultados

Tabela II.2.6 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (filme) e de MS (EI+) para 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**52**) e para a 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (**53**).

 <p style="text-align: center;">(52)</p>				
C	δ_{C} (CDCl_3)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (CDCl_3)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme, cm^{-1})	EM-IE m/z (int. rel.,%)
2	158,5	----	3343 (NH)	281(51)
3	111,9	----	2957 (CH)	266 (50)
4	151,3	----	2924 (CH)	251 (100)
4a	114,3	----	1713 (C=O)	238 (11)
5	126,2	7,46 (1H, <i>dl</i> , $J_{5,6} = 8,0$ Hz)	1622 (C=C)	223 (83)
6	114,3	6,76 (1H, <i>dl</i> , $J_{6,5} = 8,0$ Hz)	1593 (C=C)	
7	149,6	----	1512 (C=C)	
8	99,9	6,75 (1 H, <i>sl</i>)	1171 (C-O)	
8a	157,8	----		
9	19,3	2,57 (3H, <i>sl</i>)		
10	132,5	----		
11	124,8	7,17 (1H, <i>d</i> , $J_{11,12} = 8,0$ Hz)		
12	114,9	6,94 (1H, <i>d</i> , $J_{12,11} = 8,0$ Hz)		
13	154,1	----		
14	114,9	6,94 (1H, <i>d</i> , $J_{14,15} = 8,0$ Hz)		
15	124,8	7,17 (1H, <i>d</i> , $J_{15,14} = 8,0$ Hz)		
16	55,6	3,85 (3H, <i>sl</i>)		
 <p style="text-align: center;">(53)</p>				
C	δ_{C} (CDCl_3)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (CDCl_3)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme, cm^{-1})	EM-IE m/z (int. rel.,%)
2	157,7	----	3305 (NH)	329/331 (16/16)
3	108,2	----	2962 (CH)	251 (95)
4	151,2	----	1706 (C=O)	231 (100)
4a	112,4	----	1629 (C=C)	223 (64)
5	126,2	7,50 (1H, <i>dl</i> , $J_{5,6} = 8,7$ Hz)	1527 (C=C)	202 (30)
6	112,9	6,91 (1H, <i>dd</i> , $J_{6,5} = 8,7$ Hz; $J_{6,8} = 2,1$ Hz)		
7	147,9	----		
8	101,2	6,95 (1 H, <i>d</i> , $J_{8,6} = 2,0$ Hz)		
8a	153,9	----		
9	19,3	2,59 (3H, <i>sl</i>)		
10	140,0	----		
11	121,0	7,22 (1H, <i>d</i> , $J_{11,12} = 7,6$ Hz)		
12	129,7	7,39 (1H, <i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)		
13	124,0	7,14 (1H, <i>t</i> , $J = 7,4$ Hz)		
14	129,7	7,39 (1H, <i>t</i> , $J = 7,5$ Hz)		
15	121,0	7,22 (H, <i>d</i> , $J_{15,14} = 7,6$ Hz)		

A presença de um grupo anisole na molécula foi também evidenciada, no espectro de carbono, pelos cinco sinais adicionais a δ 55,6, 124,8, 114,9, 132,5, e a 154,1 ppm que correspondem aos átomos de carbono C-16, C-11 e C-15, C-12 e C-14, C-10 e C-13 respectivamente. À semelhança do que foi observado para a 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) também aqui se observa um desvio dos sinais dos prótons e dos átomos de carbono *orto* relativamente ao grupo metoxilo para campo mais alto.

No espectro de massa da 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**) observa-se um sinal que corresponde ao ião molecular $[M]^+$ a m/z 331/329 u.m.a. numa razão de 1:1 que comprova a presença de um átomo de bromo na estrutura. A clivagem da molécula com a perda do átomo de bromo origina um ião de massa m/z 251 u.m.a $[M-Br+H]^+$ e a fragmentação posterior com a perda do grupo carbonilo conduz ao ião de massa m/z 223 $[M-Br-CO+H]^+$.

O espectro de próton do composto **53** distingue-se do espectro de próton do material de partida pela presença de dois dupletos adicionais a δ 7,39 ppm e a δ 7,21 ppm que integram para dois prótons e se referem à sobreposição dos prótons H-12 e H-14 e H-11e H-15, respectivamente. Observa-se também a presença de um tripleto adicional a δ 7,14 ppm que integra para um próton relativo ao próton H-13.

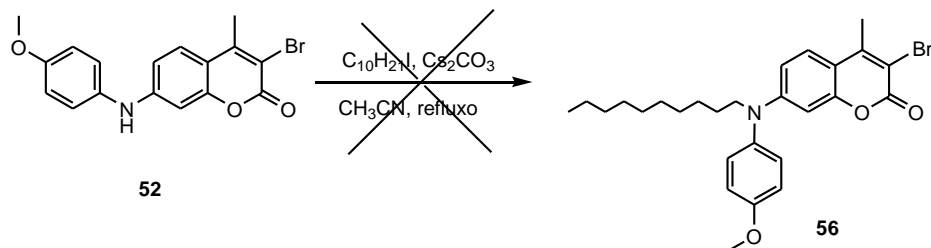
À semelhança do que foi observado para a 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**) o espectro de carbono do composto **53** apresenta quatro sinais atribuíveis aos carbonos do anel aromático a δ 121,0, 124,0, 129,7 e 140,0 ppm que se referem aos átomos de carbono C-11 e C-15, C-13, C-12 e C-14 e C-10, respectivamente.

II.2.4. Introdução de dois grupos electrodoadores adicionais na posição 7 e de um grupo electroatractor na posição 3

II.2.4.1. Estratégia de síntese de 3-bromo-7-(decil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**56**)

Por outro lado, e com o objectivo de introduzir o segundo grupo alquilo de cadeia longa electrodoador adicional, no grupo amina da posição 7, procedeu-se à reacção de alquilação da 3-

bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (**52**) com iododecano nas condições reaccionais descritas por Mao et al.¹¹⁸ i.e. na presença de carbonato de cézio em acetonitrilo em refluxo não se tendo observado a formação de **56** (esquema II.2.5) mas sim de uma mistura complexa.



Esquema II.2.5 Estratégia de síntese de 3-bromo-7-(decil(4-metoxifenil)amino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**56**).

II.2.5 SÍNTESES PRELIMINARES

II.2.5.1 Síntese de *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**57**)

Considerando a potencialidade dos corantes à base de cumarinas como sensibilizadores orgânicos propôs-se a introdução de um grupo etinileno, como ponte conjugada, com uma estrutura rígida e uma simetria axial (cilíndrica) simétrica a qual facilita a passagem de electrões¹¹⁹ e pode constituir uma alternativa à ligação dupla que conduz a valores de eficiência baixos devido a um processo de isomerização.¹²⁰ Esta estratégia foi apoiada pelo trabalho de Schiedel *et al.* o qual veio mostrar que a introdução de um grupo etinileno conjugado com um anel aromático na posição 3 da 7-amino-cumarina se traduzia num valor de rendimento quântico de fluorescência superior ao da 7-amino-4-metilcumarina e num espectro de absorção com um c.d.o. máximo desviado para a zona do vermelho.¹⁰¹

De acordo com Schiedel *et al.* os rendimentos das reacções de acoplamento cruzado de Sonogashira-Hagihara, cujo mecanismo está apresentado no Esquema II.1.14, partindo de cumarinas substituídas com grupos electrodoadores são baixos quando comparados com a reactividade da 3-bromocumarina, diminuindo quando o carácter doador de electrões dos substituintes aumentava. No entanto, a presença de um substituinte doador (metilo ou metoxilo) na posição 4 das 7-aminocumarinas resultava no aumento do grau de conversão.¹⁰²

Discussão de Resultados

De modo a favorecer a introdução do grupo etinileno na molécula de 7-amino-4-metilcumarina procedeu-se à reacção de acoplamento cruzado da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) com o prop-2-in-1-ol.

Quando se fez reagir a *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**22**) com o prop-2-in-1-ol nas condições descritas por Nascimento¹²¹ em presença da di-isopropilamina, catalizada pelo sistema catalítico constituído por dicloreto de bis-trifenilfosfina da paládio (II) PdCl₂(PPh₃)₂, por iodeto de cobre e pela fosfina aromática trifenilfosfina PPh₃ foi obtida a *N*-(3-(3-hidroxi-1-prop-1-ino)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**57**) com um rendimento de 20% (Tabela II.2.7, condição reaccional 3).

Tabela II.2.7 Reacções de acoplamento de Sonogashira-Hagihara da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) com prop-2-in-1-ol utilizando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1	2	3	4	5	6	7
Nº de equivalentes de prop-2-in-1-ol	1,5	1,5	1,5	3,75	3,75	1,5	3,75
Base (mL)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	TEA (10)
Catalisador de Pd (mol %)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (5)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (5)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (5)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (12,5)	Pd(PPh ₃) ₄ (12,5)	Pd(PPh ₃) ₄ (12,5)	Pd(PPh ₃) ₄ (12,5)
Co-catalisador de Cu (mol%)	CuI (10)	CuI (10)	CuI (10)	CuI (25)	CuI (25)	CuI (25)	CuI (25)
Ligando (mol %)	PPh ₃ (20)	PPh ₃ (20)	PPh ₃ (20)	PPh ₃ (50)	PPh ₃ (50)	PPh ₃ (50)	PPh ₃ (50)
Solvente (mL)	DMF (4)	Dioxano (10)	THF (10)	THF (10)	THF (10)	THF (10)	THF (10)
Temperatura (°C)	153	104	90	90	90	90	90
Tempo de reacção (h)	24	24	24	24	24	24 h	24 h
Resultado	---	Reacção incompleta	Reacção completa	Reacção completa	Reacção completa	Reacção incompleta	Reacção incompleta
Rendimento (η%)	---	12	20	31	40	---	---

DIPA-di-isopropilamina;TEA-trietilamina; DMF - dimetilformamida.

Nas condições anteriores verificou-se que a *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) não era solúvel em di-isopropilamina a qual era utilizada simultaneamente como base e solvente. Por isso foram testados como solventes a dimetilformamida, de difícil remoção devido à sua elevada temperatura de ebulição, o tetra-hidrofurano e o dioxano (Tabela II.2.7, condições reaccionais 1 e 2). Os melhores resultados foram obtidos com o tetra-hidrofurano como solvente o que está de acordo com o trabalho de Thorand segundo o qual existe um aumento da reactividade quando as reacções de acoplamento cruzado de Sonogashira-Hagihara são realizadas em tetra-hidrofurano, sendo os produtos obtidos com bons rendimentos e em tempos de reacção e temperaturas mais baixos.⁹⁴

Para optimização das condições reaccionais foi realizado um estudo desta reacção em que se variou a a concentração dos três componentes do sistema catalítico, nomeadamente a natureza do catalisador de paládio, a quantidade de alcino utilizado e a natureza da base o qual se encontra referido nas condições reaccionais de 4 a 7 da tabela II.2.8. Observou-se que o aumento da concentração dos componentes do sistema catalítico e a substituição do catalisador de paládio por tetraquis(trifenilfosfina) de paládio (0) resultaram num aumento do grau de conversão da reacção (condições reaccionais 4 e 5, tabela II.2.8).

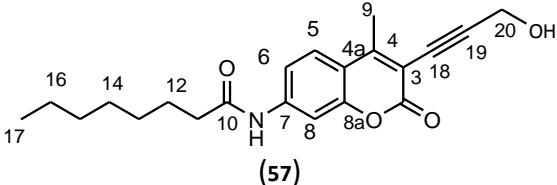
Os ensaios posteriores tiveram como objectivo aumentar o rendimento e a selectividade da reacção por diminuição da quantidade de acetileno e por variação da natureza da base utilizada. De facto, o trabalho de Thorand veio mostrar que se formavam apenas quantidades vestigiais de produtos do homo-acoplamento de alcino, quando este era adicionado lentamente, mantendo desse modo a sua concentração na mistura reaccional baixa.⁹⁴ Observou-se, no entanto, que quando se diminuiu o número de equivalentes de alcino o grau de conversão era muito baixo. Foi também utilizada a trietilamina como base como alternativa à di-isopropilamina o que levou à formação de uma mistura complexa de produtos. O método de isolamento do produto **57** por cromatografia de coluna foi também variado, tendo sido testadas como fases móveis as misturas de diclorometano e éter etílico e de clorofórmio e éter etílico. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura clorofórmio e éter etílico.

Resumindo, as melhores condições reaccionais foram conseguidas na reacção de acoplamento cruzado da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) com o prop-2-in-1-ol em tetra-hidrofurano, usando como sistema catalítico Pd(PPh₃)₄(12,5% mol)-CuI (25% mol)-PPh₃(50% mol), a di-

Discussão de Resultados

isopropilamina como base, e 3,75 equivalentes do alcino. Obteve-se, após isolamento por cromatografia de coluna em sistema de gradiente de eluição clorofórmio/éter etílico, a *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**57**) com um rendimento de 40%.

Tabela II.2.8 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (filme) e de MS (EI+) para a *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**57**).

 (57)				
C	δ_{C} (DMSO)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (DMSO)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme, cm^{-1})	EM-IE m/z (int. rel., %)
2	158,7	----	3398 (OH)	355 (14)
3	107,2	----	3314 (NH)	339 (17)
4	154,8	----	3289 (NH)	229 (54)
4a	114,3	----	2921 (CH)	213 (100)
5	126,5	7,74 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz)	2853 (CH)	200 (36)
6	115,4	7,48 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz)	2280 ($\text{C}\equiv\text{C}$)	173 (14)
7	143,0	----	1694 ($\text{C}=\text{O}$)	
8	105,1	7,76 (<i>sl</i>)	1666 ($\text{C}=\text{O}$)	
8a	152,4	----	1610 ($\text{C}=\text{C}$)	
9	17,0	2,56 (<i>sl</i>)	1568 ($\text{C}=\text{C}$)	
10	172,1	----	1530 ($\text{C}=\text{C}$)	
11	36,5	2,34 (<i>t</i> , $J = 7,3$ Hz)	1430 (CH)	
12	24,8	1,59 (<i>m</i>)	1167 ($\text{C}-\text{O}$)	
13	28,4			
14	28,5			
15	31,1	1,26 (12H, <i>m</i>)		
16	22,0			
17	13,9	0,84 (<i>m</i>)		
18	77,7	----		
19	98,5	----		
20	49,6	4,35 (<i>d</i> , $J = 5,8$ Hz)		
NH	---	10,33 (<i>sl</i>)		
OH	---	---		

As atribuições dos sinais de ^1H RMN, de ^{13}C RMN realizadas com base nas técnicas de DEPT, HMQC e HMBC encontram-se resumidas na tabela II.2.8 juntamente com os dados de IV e de MS.

O espectro de massa GC-TOF EIMS de **57** apresenta um sinal que corresponde a $[\text{M}]^+$ a m/z 355 u.m.a. A perda de um grupo metilo conduz ao íon de massa m/z 339 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$. A fragmentação da molécula com a extrusão do fragmento acilo origina um íon de massa m/z 229 $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}]^+$. A perda posterior de um grupo metilo dá origem ao íon de massa m/z 213 $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}-\text{CH}_3]^+$ correspondente ao

pico base. A clivagem posterior com a perda do grupo carbonilo leva ao íão de massa m/z 200 $[M-C_8H_{15}O-CO]^+$.

O espectro de 1H RMN em dimetilsulfóxido do composto **57** difere do espectro da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) pela presença de um duplete adicional a δ 4,35 ppm que integra para dois prótons que corresponde ao metileno CH_2 -20. Este sinal encontra-se correlacionado por HMQC com o sinal a δ 49,6 ppm do átomo de carbono C-20. Observa-se também um triplete a δ 5,38 ppm que integra para um próton corresponde ao grupo hidroxilo em C-20. A presença de um grupo hidroxilo adicional na molécula foi confirmada pela banda adicional, no espectro no infravermelho, a 3398 cm^{-1} devida às vibrações de alongamento (OH).

A presença de uma ligação tripla adicional no espectro de carbono do composto **57** foi evidenciada pelo aparecimento, no espectro de ^{13}C RMN, de dois sinais a δ 77,7 ppm e 98,5 ppm referentes aos átomos de carbono quaternários C-18 e C-19, respectivamente e foi confirmada pela presença de uma banda 2280 cm^{-1} , no espectro no infravermelho, atribuível à banda ($C\equiv C$).

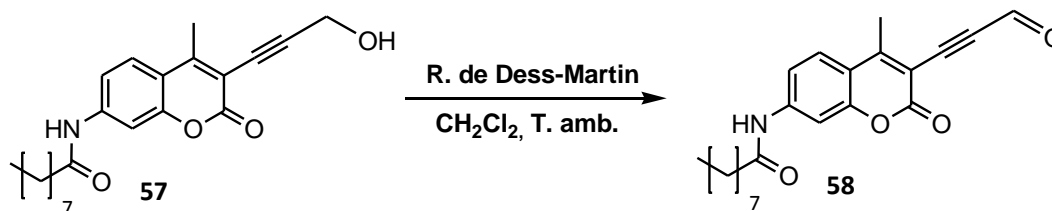
A localização do grupo etinileno na molécula foi esclarecida por correlações HMBC. Assim, observam-se correlações a longa distância entre o sinal dos prótons do grupo CH_2 -20 e o sinal do carbono quaternário em C-3 a δ 107,2 ppm. Por outro lado, a proximidade entre os prótons do metileno CH_2 -20 e os sinais dos átomos de carbono C-18 a δ 77,7 ppm e C-19 a δ 98,5 ppm foi estabelecida por correlações observadas entre estes sinais. O átomo de carbono C-18 apresenta também uma correlação a longa distância com o metilo em C-9.

II.2.5.2 Síntese de *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-ínil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**)

O passo seguinte teve como objectivo realizar a oxidação do álcool a aldeído de modo a poder ligar posteriormente o grupo aceitador, por reacção com o ácido cianoacético. O rendimento da reacção de oxidação, inicialmente realizada à temperatura ambiente sob atmosfera inerte utilizando dióxido de manganês, era muito baixo tendo sido obtido o produto pretendido em quantidade vestigial (cerca de 5%). Por isso, procedeu-se à reacção de oxidação usando como agente oxidante o reagente de Dess-Martin (12-iodo-5-triacetoxiperiodinona), o qual é útil na conversão de álcoois primários a aldeídos e cetonas à temperatura ambiente. A reacção realizada com o reagente Dess-Martin em

Discussão de Resultados

diclorometano, à temperatura ambiente originou a *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-ínil)-2H-cromen-7-il)octanamida (**58**) com um rendimento de 64%.



As atribuições dos sinais do espectro de ^1H RMN e de ^{13}C RMN do composto **58** feitas com base nas técnicas de DEPT, HMQC e HMBC e os dados espectroscópicos de IV e de MS encontram-se sumariados na tabela II.2.9.

Tabela II.2.9 Dados de ^1H RMN (400 MHz) e de ^{13}C RMN (100 MHz), de IV (KBr) e de MS (EI+) para a *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-ínil)-2H-cromen-7-il)octanamida (**58**).

 (58)				
C	δ_{C} (DMSO ₃)	δ_{H} (multiplicidade, J (Hz)) (DMSO)	IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr, cm ⁻¹)	EM-IE m/z (int. rel., %)
2	161,3	----	3351 (NH)	353 (14)
3	104,2	----	2924 (CH)	227 (100)
4	153,5	----	2853 (CH)	199 (33)
4a	114,0	----	2182 (tripla)	171 (17)
5	127,5	7,85 (d, $J_{5,6} = 9,2$ Hz)	1705 (C=O)	
6	115,6	7,50 (dl, $J_{6,5} = 8,4$ Hz)	1657 (C=O)	
7	143,1	----	1615 (C=C)	
8	105,1	7,79 (sl)	1548 (C=C)	
8a	152,4	----	1502 (C=C)	
9	17,2	2,65 (sl)	1428 (CH)	
10	172,3	----	1166 (C-O)	
11	36,2	2,36 (t, $J = 7,4$ Hz)		
12	24,5	1,58 (m)		
13	28,1*			
14	28,3*	1,27 (12H, m)		
15	30,8			
16	21,7			
17	13,8	0,85 (m)		
18	88,3	----		
19	98,8	----		
20	178,2	9,46 (sl)		
NH	10,47	10,47(sl)		

No espectro de massa GC-TOF EIMS de **58** observa-se um sinal intenso que corresponde a $[M]^+$ a m/z 353 u.m.a.. A fragmentação da molécula com perda do fragmento acilo origina o ião de massa m/z 227 u.m.a. $[M-C_8H_{14}O]^+$ que é o pico base do espectro. A clivagem posterior com a extrusão do grupo carbonilo leva ao ião de massa m/z 199 $[M-C_8H_{14}O-CO]^+$ e a saída do segundo grupo carbonilo conduz ao ião m/z 171 $[M-C_8H_{15}O-CO-CO]^+$.

O espectro de 1H RMN em dimetilsulfóxido da *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2H-cromen-7-il)octanamida (**58**) difere do da *N*-(3-(3-hidroxioprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**57**) pelo desaparecimento dos dois sinais referentes aos prótons do metileno e ao próton do grupo hidroxilo em C-20. Por outro lado, observa-se um singuleto adicional a δ 9,46 ppm que integra para um próton o qual se encontra correlacionado por HMQC com o sinal de um carbono quaternário C-20 a δ 178,2 ppm o que sugere a presença de um grupo aldeído na molécula. A presença de um grupo aldeído adicional na molécula foi confirmada pelo sinal no espectro no infravermelho pela banda a 1705 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo carbonilo.

A localização do grupo na molécula foi esclarecida pelas correlações a longa distância observadas entre o próton H-20 e os sinais dos carbonos da ligação tripla C-18 e C-19 a δ 88,3 ppm e a 98,8 ppm, respectivamente. Foram também observadas correlações a longa distância entre átomos de C-18 e C-19 e os prótons do metilo CH_3 -9 a δ 2,65 ppm e do metino CH-20 a δ 9,46 ppm. A presença de uma ligação tripla é confirmada pela presença de uma banda 2281 cm^{-1} , no espectro no infravermelho, atribuível ao estiramento da tripla ligação ($C\equiv C$).

Pensa-se que o mecanismo da oxidação do álcool com o reagente de Dess-Martin se processa por um mecanismo de dois passos (Figura II.2.4). No primeiro passo ocorre o deslocamento de um grupo acetato pelo álcool. No segundo passo ocorre a quebra da ligação acetato-iodo, o próton α - do álcool é removido pelo acetato originando o grupo carbonilo e ocorre a redução do átomo de iodo.^{122,123}

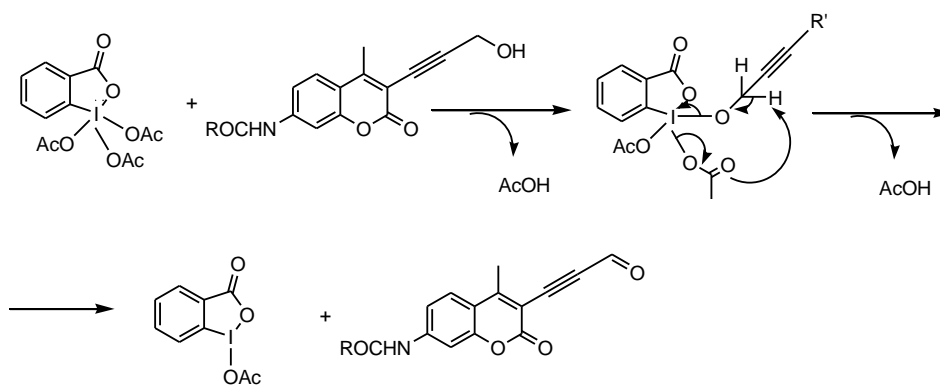
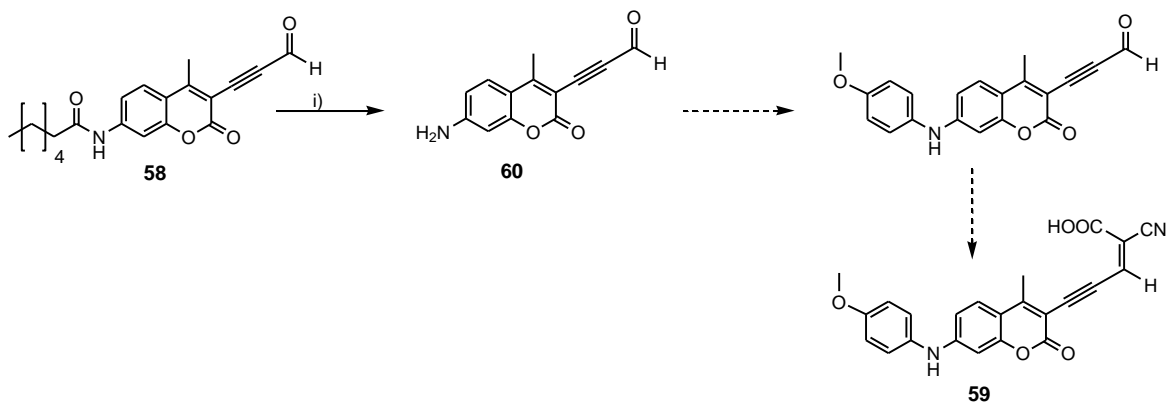


Figura II.2.4 Mecanismo da reacção de oxidação.

II.2.5.3 Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-ciano-5-(7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)pent-2-en-4-inóico (59)

Com a finalidade de introduzir um grupo electrodoador aromático, uma ponte conjugada e um grupo aceitador pretendeu-se proceder à hidrólise da *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2H-cromen-7-il)octanamida (58) seguida da reacção de acoplamento de Buchwald-Hartwig para introdução do grupo doador no grupo amina da posição 7 e por último à reacção com o ácido cianoacético para introduzir o grupo aceitador (Esquema II.2.6).



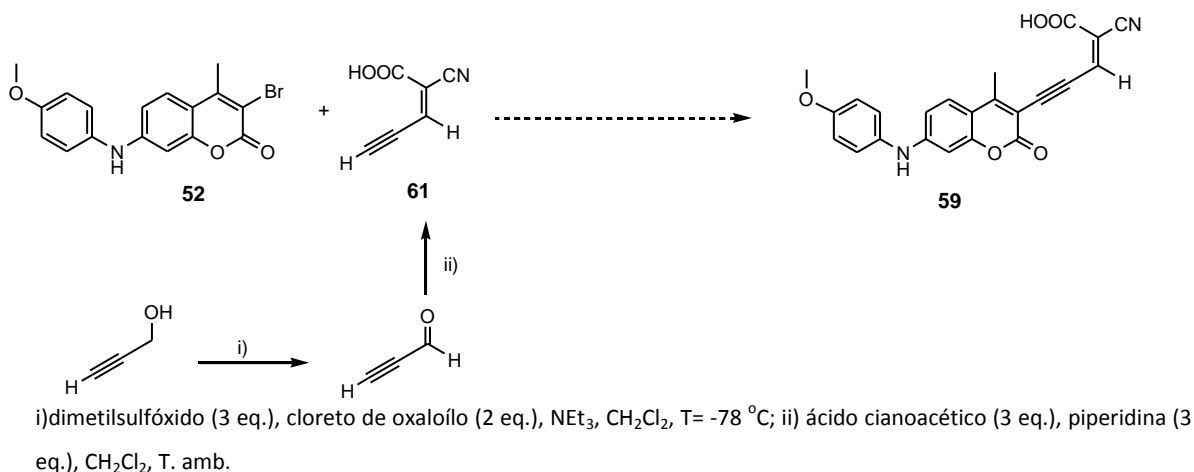
i) HCl (1M), dioxano; H₂SO₄ (10%), dioxano.

Esquema II.2.6 Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-ciano-5-(7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-3-il)pent-2-en-4-inóico (59).

No entanto, a reacção de hidrólise da *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**) em dioxano utilizando uma solução de ácido clorídrico 1M ou uma solução de ácido sulfúrico a 10% a refluxo apenas originou quantidades vestigiais do produto pretendido. A presença simultânea na mesma estrutura de um grupo amino ou de um grupo aldeído poderá ter dado origem a reacções paralelas que conduziram à mistura complexa.

II.2.5.4 Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-cianopent-2-en-4-inóico (**61**)

Paralelamente e com a finalidade de introduzir simultaneamente o fragmento ponte conjugada e o grupo aceitador na posição 3 da molécula de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**52**) foi testada a síntese de ácido 2-cianopent-2-en-4-inóico (**61**) a partir da oxidação de Swern do álcool propargílico¹²⁴ e posterior condensação de Knoevenagel com o ácido cianoacético¹²⁵ mas não se observou a formação do produto pretendido (Esquema II.2.7).



Esquema II.2.7 Estratégia de síntese de ácido (Z)-2-cianopent-2-en-4-inóico (**61**).

Na oxidação de Swern a activação do dimetilsulfóxido ocorre através da acilação com o cloreto de pivaloílo como electrófilo na qual ocorre o ataque do carbonilo pelo átomo de oxigénio do dimetilsulfóxido e a libertação do anião cloreto. Este liga-se ao átomo de enxofre carregado positivamente com a expulsão do ácido piválico e origina um ião clorosulfónio electrofílico o qual reage então com o álcool propargílico originando um novo sal sulfónio que é suficientemente estável para ser desprotonado pela trietilamina dando origem ao aldeído correspondente.¹⁰⁷

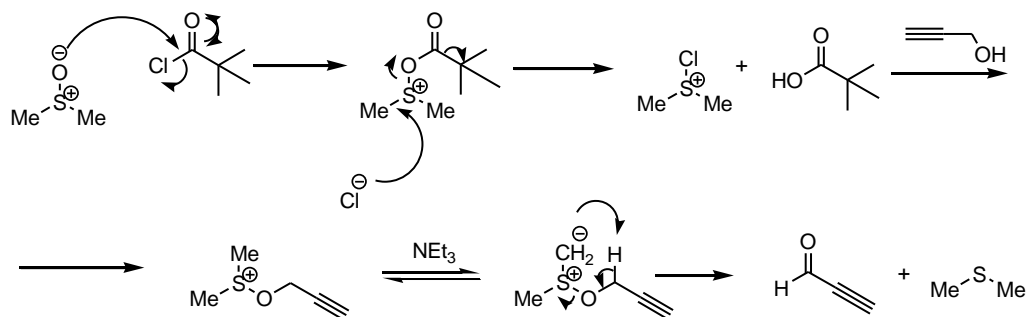


Figura II.2.5 Mecanismo da oxidação de Swern.

Na condensação de Knoevenagel ocorre a abstracção de um dos protões ácidos do ácido cianoacético pela base originando um ião enolato, seguida pelo ataque subsequente deste ao carbonilo do grupo aldeído para formar um ião alcóxido sendo que a eliminação posterior ocorre devido a acidez do protão α e à estabilização que advém da formação de uma ligação dupla conjugada.

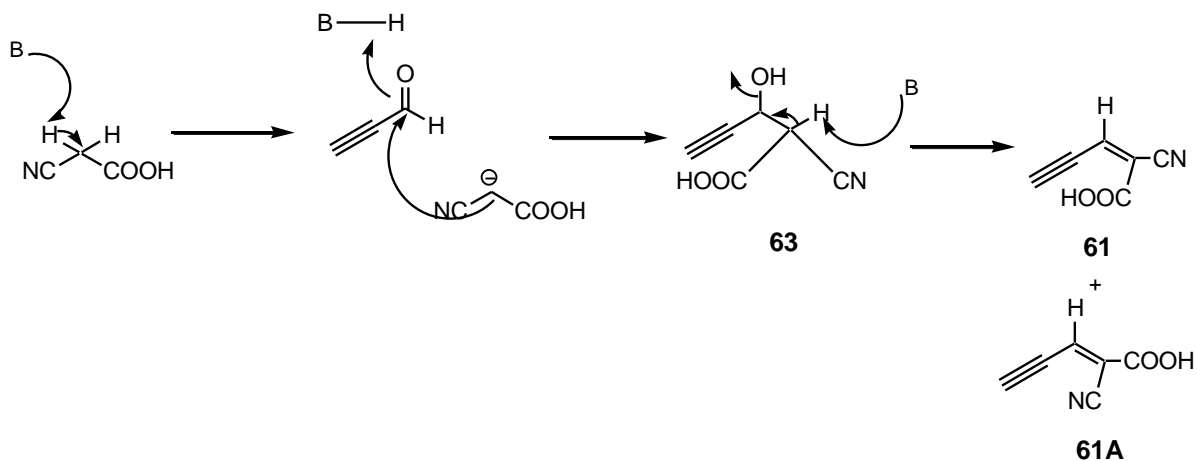


Figura II.2.6 Mecanismo da condensação de Knoevenagel.

A aplicação das condições reaccionais descritas por Dubey *et al.*¹²⁴ e por Cho *et al.*¹²⁵ originou não o ácido 2-cianopent-2-en-4-inóico (**61**) esperado mas o (*E*)-3-(piperidin-1-il)acrilaldeído (**62**). A formação do composto **62** pode ser explicada pela não desejável, mas expectável ocorrência de uma adição conjugada de Michael da piperidina ao propionaldeído, produto da oxidação de Swern.

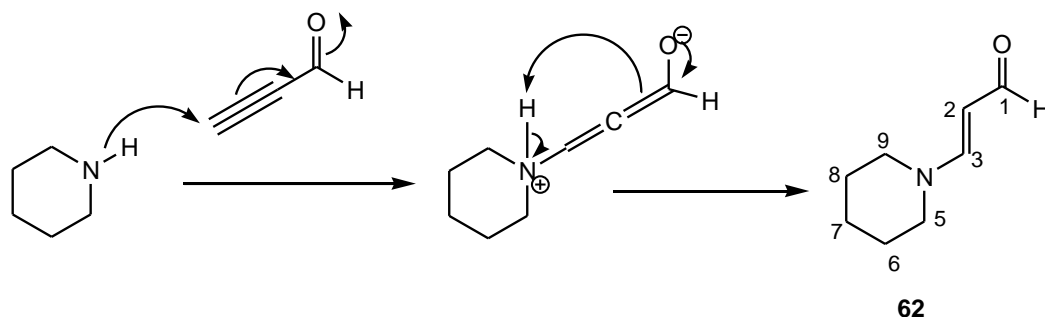


Figura II.2.7 Mecanismo da adição de Michael.

O espectro de ^1H RMN do (*E*)-3-(piperidin-1-il)acrilaldeído (**62**) apresenta um duplete a δ 9,06 ppm (1H, $J = 8,0$ Hz) característico do protão do grupo aldeído em C-1 e os sinais atribuíveis aos protões H-2 e H-3 de uma olefina *trans*-dissubstituída a δ 6,98 ppm (1H, d , $J = 12,0$ Hz) e a δ 5,22 ppm (1H, dd , $J = 12,0$ Hz, $J = 8,0$ Hz). Surgem ainda no espectro de protão dois singletos largos parcialmente sobrepostos a campo baixo, atribuíveis aos protões dos grupos metileno em C-5 e em C-9 a δ 3,35 ppm e 3,26 ppm. O singuleto largo que integra para seis protões e se refere aos restantes protões metilénicos surge a campo alto a δ 1,67 ppm.

No espectro de ^{13}C RMN observa-se a presença de seis sinais. A experiência DEPT permitiu a diferenciação dos sinais indicando a presença de três sinais referentes a grupos metileno a δ 55,0, 46,3 e 23,9 ppm que correspondem aos sinais dos carbonos metilénicos adjacentes ao átomo de azoto e à sobreposição dos sinais dos carbonos C-6, C-7 e C-8. Foi também revelada a presença de dois grupos metino em C-3 e C-2 aos quais correspondem os sinais a δ 159,4 ppm e δ 100,7 ppm, respectivamente, e do carbono quaternário referente ao carbonilo de um aldeído em δ 189,6 ppm.

No âmbito de um trabalho paralelo executado no laboratório por um aluno no projecto final de licenciatura¹²⁶ foram realizadas a oxidação de Swern e a condensação de Knoevenagel *in situ* e seguidas por RMN durante 6 dias, sendo que o tempo que decorreu entre cada espectro efectuado foi variável.

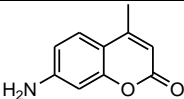
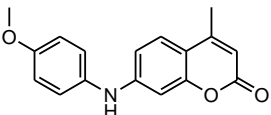
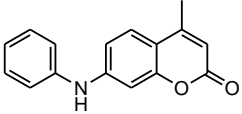
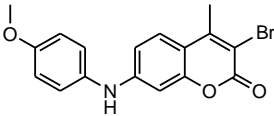
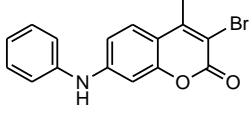
Neste estudo, procedeu-se à oxidação de Swern do álcool propargílico por adição do álcool propargílico a uma mistura de dimetilsulfóxido e de cloreto de pivalóilo, a -78°C durante um período de tempo necessário ao consumo de álcool propargílico (seguido por c.c.f.) seguida da adição de ácido cianoacético. O espectro de ^1H RMN traçado após a oxidação de Swern e antes da adição do ácido

cianoacético revelou a presença de um sinal a δ 9,54 ppm que é indicativo da presença do aldeído, à semelhança do que tinha sido observado anteriormente. Foi então realizada a adição *in situ* do ácido cianoacético, sem a presença da piperidina, e a composição da mistura reaccional analisada por RMN. Após alguns dias de reacção, o estudo por RMN revelou a formação de uma mistura complexa onde a presença dos sinais no espectro de protão a δ 10,46 ppm, δ 4,05 ppm, a δ 3,41 ppm e a δ 2,33 ppm poderá ser indicativa da presença do produto de adição (**63**) antes da desidratação. Também o espectro de ^{13}C RMN apresentou os sinais característicos do produto **63** a δ 165,1 ppm, 114,7 ppm, 82,3 ppm, 74,4 ppm, 49,2 ppm e 37,8 ppm. Dada a complexidade da mistura que poderá resultar da reactividade do próprio composto em reacções de adição intramoleculares, optou-se por não se prosseguir com este estudo.

II.2.6 Efeito da variação de grupos electrodoadores e electroatractores nos espectros de absorção dos derivados de cumarinas 44, 45, 52 e 53

Com o objectivo de avaliar o efeito da introdução dos grupos introduzidos na posição 7 e na posição 3 da 7-amino-4-metil-cumarina (**43**) nos valores dos c.d.o. máximos dos espectros de absorção UV-Vis dos derivados **44**, **45**, **52** e **53** foram traçados os espectros de absorção normalizados ao comprimento de onda máximo de absorção em etanol e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela II.2.10.

Tabela II.2.10 Efeito da introdução de grupos electrodoadores e electroatractores nos espectros de absorção dos derivados de cumarinas em etanol.

Nº	Composto	Absorção	
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
43		354	18500 ¹²⁷
44		374	8490
45		372	9570
52		385	9680
53		384	9630

A Figura II.2.9 apresenta os espectros de absorção dos compostos **43**, **45** e **53** em solução. A introdução de um grupo fenilo planar no grupo amina na posição 7 provocou um ligeiro desvio do máximo de absorção para a zona do vermelho ($\lambda_{\text{máx}}$ =372 nm) o que pode ser atribuído à expansão da conjugação do sistemas de electrões π com fragmentos aromáticos.¹²⁸

Por outro lado observou-se que a introdução deste grupo resultou num ligeiro decréscimo do valor do coeficiente de extinção molar observado para o composto **45**, o que pode ser atribuído aos valores de Hammett¹²⁹ baixos que indicam propriedades de transferência de carga insignificantes. De acordo com Liu *et al.* esse carácter doador/aceitador fraco resulta num efeito *push-pull* na transferência de carga intramolecular (ICT) baixo contribuindo para um valor baixo de ϵ .⁵²

O efeito batocrómico observado foi reforçado pela introdução do átomo de bromo na posição 3 do anel da cumarina do composto **53**. Sendo o bromo um átomo electroatractor por efeito indutivo vai favorecer a transferência de carga intramolecular (ICT) que ocorre ao longo do eixo maior, à qual corresponde a um valor de energia necessária para ocorrer (de S_0 para S_1) menor do que se tivesse lugar ao longo do eixo menor (de S_0 para S_2) (Figura II.2.9).

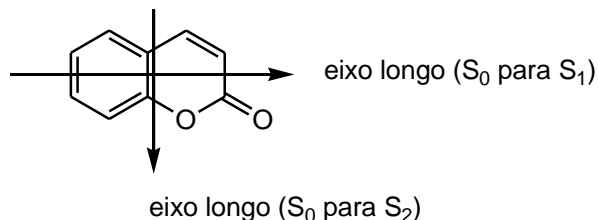


Figura II.2.8 Direcção da transferência de carga nas cumarinas.⁵²

Consequentemente, os espectros de absorção e emissão de luz são determinados pela transferência de carga ao longo do eixo maior e qualquer substituinte que contribua para esta direcção da transferência de carga intramolecular produz um impacto nos desvios dos c.d.o dos derivados de cumarinas.⁵²

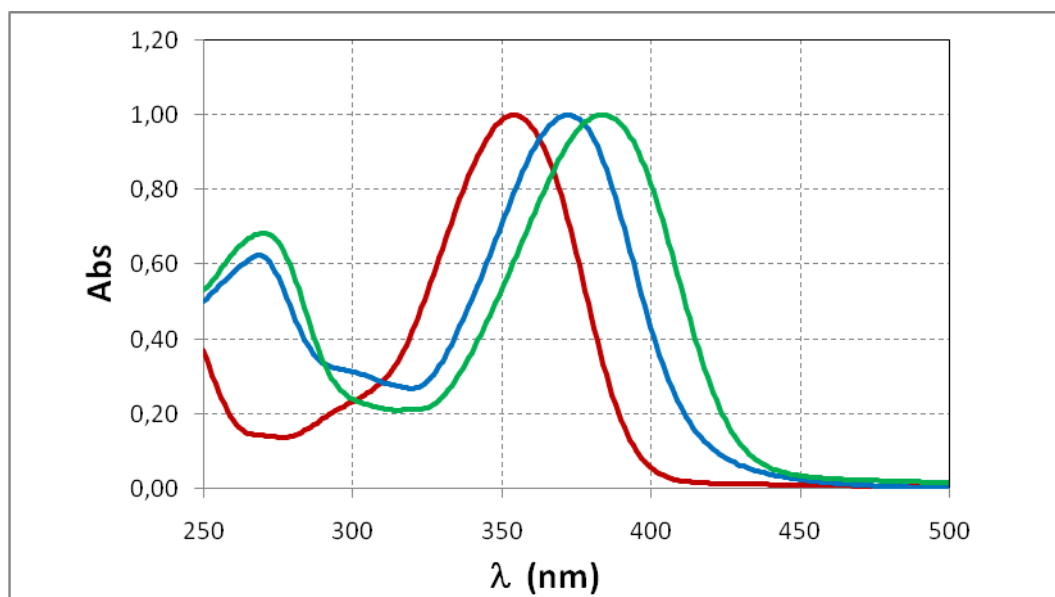


Figura II.2.9-Espectros de absorção normalizados ao comprimento de onda máximo de absorção da 7-amino-4-metil-cumarina (**43**) a vermelho, da 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**) a azul e da 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**53**) a verde em etanol.

Comparando os c.d.o. máximos dos compostos **43**, **44** e **52** observa-se um efeito batocrómico análogo aos dos compostos anteriores. No entanto, não se observou uma variação significativa pela introdução de um grupo metoxilo adicional no anel aromático na molécula (Figura II.2.10).

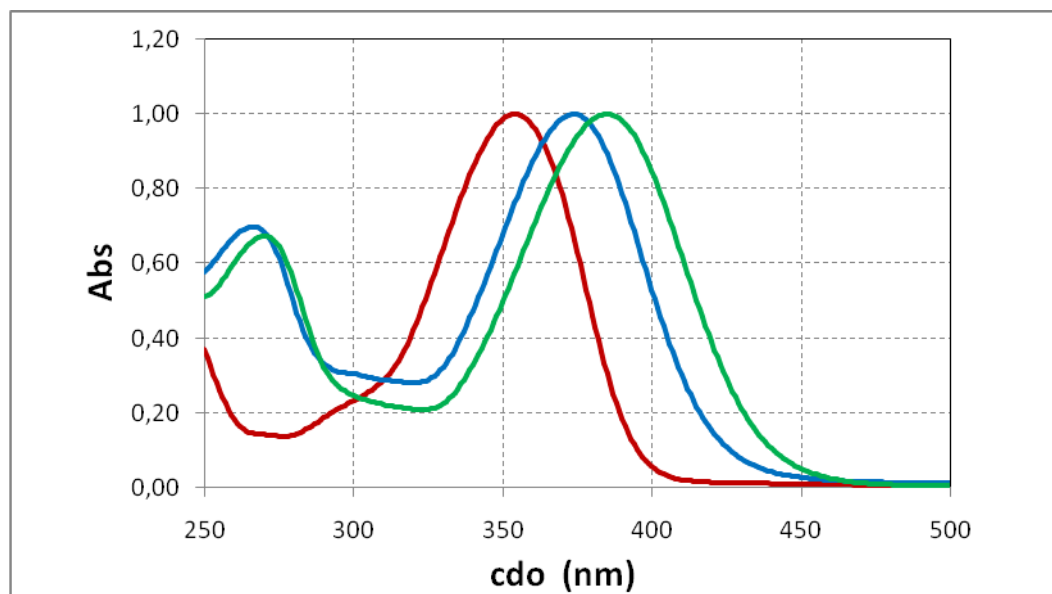


Figura II.2.10-Espectros de absorção normalizados ao comprimento de onda máximo de absorção da 7-amino-4-metil-cumarina (**43**) a vermelho, da 7-(4-metoxifenilamino)-cumarina (**44**) a azul e da 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**52**) a verde em etanol.

Com o objectivo de prosseguir este estudo que visa compreender o efeito da introdução de diferentes fragmentos para compreender as origens moleculares das propriedades optoelectrónicas dos corantes à base de cumarinas e estabelecer os *building blocks* requeridos seria interessante proceder à reacção de acoplamento de Sonogashira-Hagihara da 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**52**) e da 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**53**) com o propen-2-in-1-ol seguida da reacção de oxidação do álcool com o reagente de Dess-Martin e traçar os espectros de absorção dos compostos obtidos.

II.2.7. Conclusões

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos pelas diferentes estratégias adoptadas na síntese de novos cromóforos derivados da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) a qual se encontra resumida no esquema II.2.8.

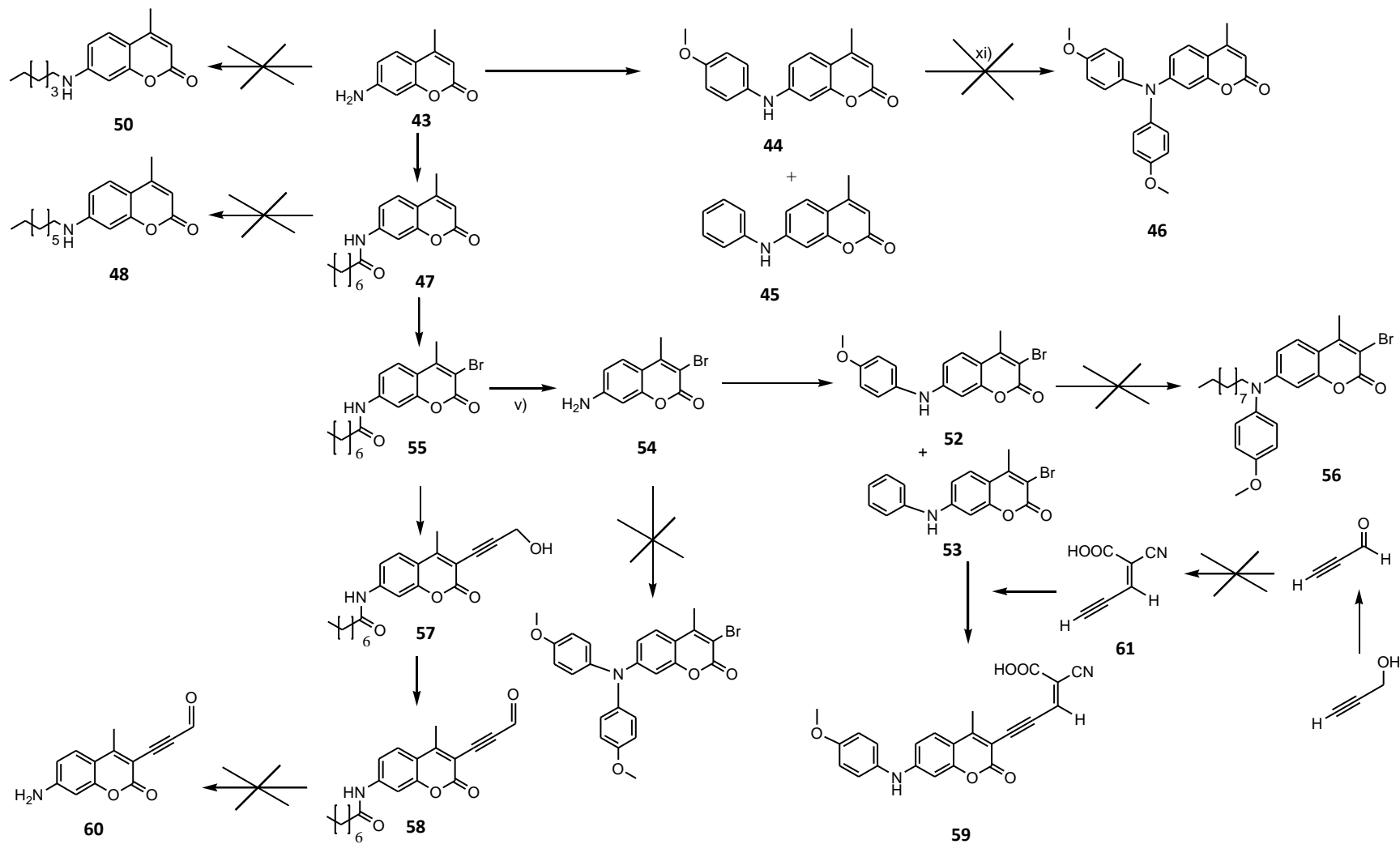
Para ultrapassar os reduzidos tempos de vida de emissão observados para os corantes derivados de cumarinas foi introduzido um grupo doador adicional na molécula. Neste sentido foram preparados os compostos 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**44**) e 4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**45**).

De modo a introduzir um segundo grupo doador aromático nos compostos **44** e **45** foi feito um estudo da reacção de Buchwald-Hartwig em que foi variada a natureza do catalizador de paládio, o volume de solvente e o tempo de reacção sem que se observasse a formação do composto **46** pretendido.

Com o intuito de introduzir um grupo doador aromático e uma cadeia alquílica foi ensaiada a redução da *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**), obtida por acilação da 7-amino-4-metilcumarina (**43**), com hidreto de alumínio e lítio ou borano. Recorreu-se ainda a uma reacção de aminação redutiva da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) com hexanal seguida da redução com cianoborohidreto de sódio ou borohidreto de sódio. Em qualquer dos casos não foi observada a formação dos produtos respectivos.

A introdução de um segundo grupo alquilo de cadeia longa doador adicional foi ensaiada através da reacção de alquilação com iododecano na presença de carbonato de cézio mas não se obteve o composto **56** pretendido.

A introdução selectiva de um átomo de bromo na posição 3 da 7-(metoxifenilamino)-4-metilcumarina (**44**), de modo a posteriormente por uma reacção de Sonogashira-Hagihara introduzir um grupo electroatractor na posição 3 que desvie o máximo de c.d.o. para a zona do vermelho e aumente a eficiência de absorção de luz, realizou-se a bromação da *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) seguida da hidrólise do grupo amida em meio ácido. A reacção posterior de acoplamento de Buchwald-Hartwig de **54** com iodoaniso ou iodobenzeno permitiu a síntese dos compostos, 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**52**) e 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**).

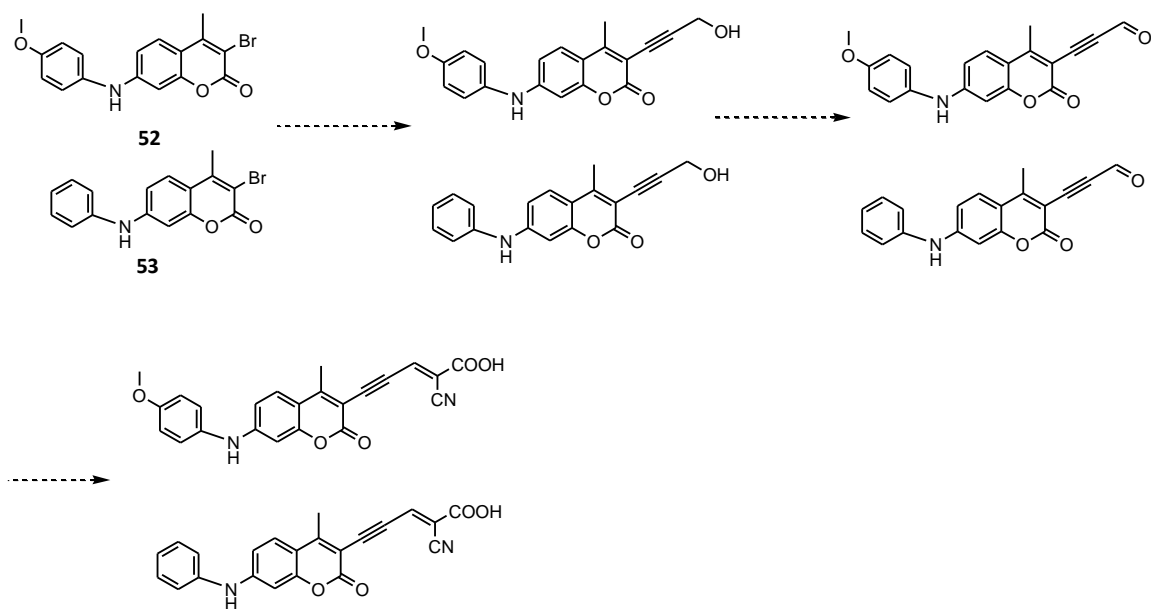


Esquema II.2.8

Considerando a potencialidade dos corantes à base de cumarinas como sensibilizadores orgânicos propôs-se a introdução de um grupo etinileno, como ponte conjugada, com uma estrutura rígida e uma simetria axial (cilíndrica) a qual facilita a passagem de electrões através da reacção de acoplamento cruzado de Sonogashira-Hagihara da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**55**) com o prop-2-in-1-ol. A *N*-(3-(3-hidroxi-prop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**57**) obtida foi oxidada originando a *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**) com o reagente de Dess Martin. Para introduzir um grupo doador aromático na molécula na posição 7-amino de **58** foi ensaiada a hidrólise utilizando diferentes condições mas a reacção não ocorreu.

Paralelamente e com a finalidade de introduzir simultaneamente o fragmento ponte conjugada e o grupo aceitador na posição 3 da molécula de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**52**) foi testada a síntese de ácido 2-cianopent-2-en-4-inóico (**61**) a partir da oxidação de Swern do álcool propargílico e posterior reacção com o ácido cianoacético. Mas o processo de oxidação utilizado não se mostrou satisfatório.

Outra via a ensaiar de futuro para a preparação de um corante orgânico derivado de cumarinas seria o acoplamento de Sonogashira-Hagihara da 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-cumarina (**52**) e da 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-cumarina (**53**) com propen-2-in-1-ol para introdução do grupo etinileno (ponte conjugada), seguido da oxidação a aldeído e condensação de Knoevenagel com o ácido acético. Simultaneamente e com o objectivo de prosseguir o estudo que visa compreender as origens moleculares das propriedades optoelectrónicas destes corantes seria interessante traçar os espectros de absorção respectivos (Esquema II.2.9).



Esquema II.2.9

Por outro lado seria interessante fazer um estudo do efeito da variação do comprimento e da ramificação do grupo alcoxilo substituinte do anel aromático a introduzir via reacção de Buchwald-Hartwig nos produtos finais obtidos após oxidação e condensação de Knoevenagel, de acordo com o Esquema II.2.9. A introdução de grupos alcoxilo de cadeia longa e/ou ramificada teria a vantagem de evitar a agregação e de conferir estabilidade térmica.

Capítulo II.3

**Síntese de cromóforos derivados de cumarinas com possíveis aplicações
em dispositivos fotovoltaicos**

PARTE EXPERIMENTAL

II.3.1 Equipamento e condições experimentais

Os solventes utilizados foram secos e/ou destilados por métodos padronizados.¹³⁰

As reacções foram seguidas por cromatografia de camada fina (c.c.f.) utilizando placas de sílica gel 60 F254 20x20 (Merck nº 5554, Darmstadt, Alemanha) de 0,2 mm de espessura. O eluente é referido em cada caso.

Após eluição, as placas foram observadas sob radiação ultravioleta no comprimento de onda 254 nm e 366 nm, tendo sido reveladas com iodo ou por pulverização com solução adequada a cada composto em estudo. Foram usados como reveladores KMnO_4 , solução de solução de dinitrofenil-hidrazina e de Dragendorff de Munier.¹³¹

O isolamento dos produtos foi realizado por cromatografia de coluna *flash* utilizando sílica gel 60, 230-400 mesh (Merck nº 9385, Darmstadt, Alemanha) desactivada com água a 10% enquanto que na cromatografia gravítica foi realizada com sílica gel 60, 70-230 mesh (Merck nº 7734) desactivada com água a 10%. O eluente utilizado é referido em cada caso. Nas cromatografias em placa preparativa foram usadas placas de sílica gel F₂₅₄ (Merck nº 5744, Darmstadt, Alemanha) de 0,5 mm de espessura. O eluente utilizado é referido em cada caso.

Os espectros de absorção UV/Vis foram obtidos num espectrofotómetro de feixe duplo JascoV-660, na gama de comprimentos de onda compreendida entre 250 e 600 nm. Todas as medidas foram realizadas em células de quartzo com um percurso óptico de 1 cm, à temperatura ambiente, tendo as soluções sido preparadas em etanol de grau espectroscópico.

Os espectros no infravermelho (IV) foram registados num espectrofotómetro de transformada de Fourier FT-IR Perkin Elmer modelo 1000, em pastilha de KBr ou filme em célula de NaCl, sendo indicado em cada caso o processo utilizado. Na descrição de cada espectro, os dados são indicados na seguinte ordem: suporte da amostra - KBr (em pastilha de brometo de potássio) ou filme (em célula de NaCl); número de onda máximo de banda de absorção - $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (em cm^{-1}); atribuição da vibração a uma ligação entre átomos da molécula.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN) e de carbono (^{13}C RMN), foram registados num espectrómetro Bruker modelo ARX-400 (400 MHz) ou modelo Avance III (600 MHz). Como solventes foram usados CDCl_3 , CD_3OD e $\text{DMSO}-d_6$, usando como referência os sinais

residuais dos solventes (clorofórmio: δ 7,26 ppm e 77,0 ppm; metanol: δ 3,30 ppm e 49,0 ppm; dimetilsulfóxido: δ 2,49 ppm e 39,7 ppm). Na descrição de cada espectro os dados são indicados pela ordem seguinte: solvente; desvio químico - δ (em ppm); intensidade relativa - nH (como número de prótons); multiplicidade do sinal - *s* (singuleto), *sl* (singuleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplete duplo), *t* (triplete), *q* (quarteto) e *m* (multiplete); constante de acoplamento - *J* (em Hz); atribuição a prótons da molécula. A presença de prótons lábeis foi confirmada após adição de D₂O e observada a permuta com deutério.

Os espectros de massa de GC-EIMS foram traçados num espectrómetro de massa Micromass GC-TOF (GCT) com uma coluna DB1 (d.i. = 0.32 mm; espessura de filme = 0.25 μ m; comprimento = 30 m). As condições de GC usadas foram: He como gás de transporte; razão de split 1:10; temperatura de injeção, 250 °C; programa de temperaturas, 120 °C durante 3 min, gradiente de 5 °C/min to 300 °C, durante 10 min. Os espectros de massa de impacto electrónico usando um aparelho Micromass Autospec foram ainda realizados na Unidade de espectrometria de Massa da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

II.3.2 Síntese de 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**44**) e de 4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**45**)

Procedimento geral:

A um balão de duas tubuladuras purgado cerca de 20 minutos com um fluxo de azoto foi adicionada base e um volume de dioxano seco. Adicionaram-se sucessivamente o ligando, o catalisador de paládio e o 4-iodoanisole. Finalmente foi adicionada a 7-amino-4-metilcumarina (7-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ona **43**). O sistema foi purgado com azoto cerca de 5 minutos após cada adição. A mistura ficou a refluxo com agitação em atmosfera inerte durante 48 horas até o material de partida ser consumido. A reacção foi seguida por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas foram visualizadas a λ = 254 e 366 nm. A mistura reaccional foi concentrada a pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna gravítica em sílica gel utilizando o clorofórmio como eluente. Destas separações resultaram a 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**44**) e a 4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**45**) (Tabela 1).

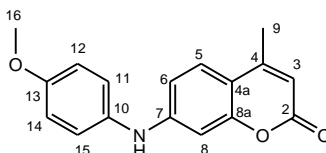
Parte Experimental

Tabela 1 Reacções de Buchwald-Hartwig da 7-amino-4-metilcumarina (**43**) usando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1 ^a	2 ^b	3 ^b	4 ^c	5 ^c	6 ^c
Material de partida (mg; mmol)	(50; 0,285)	(50,0; 0,28)	(100; 0,57)	(100; 0,57)	(40; 0,228)	(100; 0,57)
4-iodoanisol (mg; mmol)	(53,8; 0,230)	(55,6; 0,24)	(222,4; 0,95)	(266,8; 1,14)	(106,9; 0,457)	(266,8; 1,14)
Base (mg; mmol)	NaO- <i>t</i> -Bu (27,4; 0,285)	Cs ₂ CO ₃ (108,3; 0,33)	Cs ₂ CO ₃ (433,2; 1,33)	Cs ₂ CO ₃ (557,2; 1,71)	Cs ₂ CO ₃ (222,9; 0,684)	Cs ₂ CO ₃ (557,2; 1,71)
Catalisador de Pd (mg; mol %)	(DPPF)PdCl ₂ (9,4; 4)	Pd(OAc) ₂ (5,3; 10)	Pd(OAc) ₂ (21,2; 20)	Pd(OAc) ₂ (12,8; 10)	Pd(OAc) ₂ (0,9; 4)	Pd(OAc) ₂ (5,1; 4)
Ligando (mg; mol %)	DPPF (19; 12)	BINAP (22,2; 15)	BINAP (46,7; 7,8)	Xantphos (33; 10)	Xantphos (5,3; 4)	Xantphos (26,4; 8)
Temperatura(°C)	104	104	104	104	104	104°C
Tempo de reacção(h)	48	48	72	48	48	48
Resultado	Reacção incompleta	Reacção incompleta	Reacção incompleta	Reacção completa	Reacção incompleta	Reacção incompleta
Produtos 44/45 (η%)	-----	11/9	29/15	61/16	----	----

^a Driver, M.S., Hartwig, J.F. J. Am. Chem. Soc., 118 (30), 7217-7218 (1996); ^b Wolfe, J.P., Buchwald, S.L., J. Org. Chem., 65, 1144-1157 (2000); ^c Soussi, M.A., Audisio, D., Messaoudi, S., Provot, O., Brion, J.D., Alami, M., Eur. J. Org. Chem., 5077-5088 (2011).

7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**44**)



obtida de acordo com as condições reaccionais 4 (tabela 1) com um rendimento de 61% na forma de filme amarelo apresenta:

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH): 374 ($\epsilon=8490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

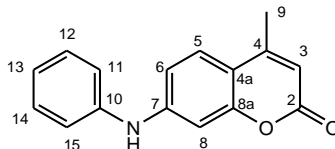
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3302 (NH), 2923, 2852 (CH), 1704 (C=O), 1620 (C=C), 1170 (C-O).

¹H RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 7,40 (1H, *dl*, $J_{5,6} = 8,0 \text{ Hz}$, H-5); 7,17 (2H, *d*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-11 e H-15); 6,93 (2H, *d*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-12 e H-14); 6,76 (1 H, *sl*, H-8); 6,75 (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,0 \text{ Hz}$, H-6); 6,04 (1H, *sl*, H-3); 3,85 (3H, *sl*, CH₃-16); 2,38 (3H, *sl*, CH₃-9).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, CDCl_3): 162,0 (C-2), 156,7 (C-8a), 155,5 (C-13), 152,5 (C-4), 149,5 (C-7), 132,9 (C-10), 124,3 (C-11), 124,3 (C-15), 114,8 (C-12), 114,8 (C-14), 111,9 (C-3), 110,2 (C-4a), 125,8 (C-5), 111,3 (C-6), 100,3 (C-8), 55,5 (C-16), 18,5 (C-9).

GC TOF EIMS modo positivo m/z (int. rel.): 281 $[\text{M}]^+$ (84), 266 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (100), 253 (6), 238 (20).

4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (**45**)



obtida de acordo com as condições reacionais 4 (tabela 1) com um rendimento de 16% na forma de filme amarelo apresenta:

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH): 372 ($\epsilon=9570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3304 (NH), 2923, 2853 (CH), 1704 (C=O), 1630 (C=C), 1163 (C-O).

^1H RMN δ (400 MHz, CDCl_3): 7,44 (1H, *dl*, $J_{5,6} = 8,0 \text{ Hz}$, H-5); 7,37 (2H, *t*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-12 e H-14); 7,21 (2H, *d*, $J_6 = 8,0 \text{ Hz}$, H-11 e H-13); 7,11 (1H, *t*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-13); 6,98 (1 H, *sl*, H-8); 6,92 (1H, *dd*, $J = 8,0 \text{ Hz}$ e $4,0 \text{ Hz}$, H-6); 6,08 (1H, *sl*, H-3); 2,65 (3H, *sl*, CH_3 -9).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, CDCl_3): 161,6 (C-2); 155,6 (C-8A);. 152,4 (C-4); 147,5 (C-10); 140,3 (C-7); 129,5 (C-14); 129,5 (C-12); 125,6 (C-5); 123,6 (C-13); 120,7 (C-15); 120,7 (C-11); 112,7 (C-4A); 112,3 (C-3); 110,8 (C-6); 101,7 (C-8); 18,5 (C-9).

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 251 $[\text{M}]^+$ (100), 223 (83), 194 (18).

II.3.3 Reacção de arilação de 7-(4-metoxifenil)amino)-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**44**)¹³²

A um balão de duas tubuladuras purgado cerca de 20 minutos com um fluxo de azoto foi adicionada base e um volume de dioxano seco. Adicionaram-se sucessivamente o ligando, o catalisador de

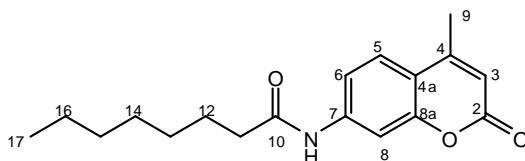
paládio e o 4-iodoanisole. Finalmente foi adicionada a 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**44**). O sistema foi purgado com azoto cerca de 5 minutos após cada adição. A mistura ficou a refluxo com agitação em atmosfera inerte. A reacção foi seguida por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas foram visualizadas a $\lambda = 254$ e 366 nm. (Tabela 2)

Tabela 2 Reacções de Buchwald-Hartwig da 7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**44**) utilizando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1 ^a	2	3	4
Material de partida (mg; mmol)	(45,7; 0,163)	(20,4; 0,072)	(24,8; 0,088)	(25,2; 0,090)
4-iodoanisole (mg; mmol)	(76,3; 0,326)	(34,0; 0,145)	(41,2; 0,176)	(42,1; 0,180)
Base (mg; mmol)	Cs ₂ CO ₃ (159,4; 0,489)	Cs ₂ CO ₃ (70,4; 0,216)	Cs ₂ CO ₃ (86,0; 0,264)	Cs ₂ CO ₃ (88,0; 0,27)
Catalisador de Pd (mg; mol %)	Pd(OAc) ₂ (3,7; 10)	PdCl ₂ (1,3; 10)	Pd ₂ (dba) ₃ (9,1; 10)	Pd ₂ (OAc) ₂ (2,0; 10)
Ligando (mg; mol %)	Xantphos (9,4; 10)	Xantphos (4,2; 10)	Xantphos (5,1; 10)	Xantphos (5,2; 10)
Solvente (mL)	Dioxano (10)	Dioxano (5)	Dioxano (5)	Dioxano (2)
Tempo de reacção (h)	48	72	72	72
Resultado	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto

^aSoussi, M.A., Audisio, D., Messaoudi, S., Provot, O., Brion, J.D., Alami, M., Eur. J. Org. Chem., 5077-5088 (2011).

II.3.4. Síntese de *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**)



A uma solução de 7-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**43**) (200 mg; 1,14 mmol) em dioxano seco (80 mL) foi adicionada, em atmosfera inerte, piridina seca (277 μ L; 3,42 mmol) e cloreto de octanoílo (584 μ L; 3,42 mmol). A mistura ficou em agitação à temperatura ambiente durante 1 hora tendo a reacção sido seguida por cromatografia de camada fina (CH₂Cl₂/MeOH) (10/0,3) (V/V) e as placas visualizadas sob radiação UV ($\lambda = 366$ nm). A mistura reaccional foi concentrada sob pressão reduzida tendo sido obtido um sólido branco em suspensão, o qual foi filtrado e a suspensão foi neutralizada com uma solução de ácido clorídrico (1 M) e água destilada. O sólido branco foi seco na estufa a 100 °C durante

a noite, tendo sido obtida a *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) (267,8 mg; 78 %) na forma de sólido amorfo creme apresentando:

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3294 (NH), 2953, 2918, 2870, 2851 (CH), 1710 (C=O), 1688 (C=O), 1588, 1528, 1466 (C=C), 1407 (CH), 1173 (C-O).

^1H RMN δ (400 MHz, DMSO): 10,29 (1H, *s*l, NH); 7,75 (1 H, *s*l, H-8); 7,68 (1H, *d*, $J_{5,6} = 8,4$ Hz, H-5); 7,46 (1H, *d*, $J_{6,5} = 8,4$ Hz, H-6); 6,23 (1H, *s*l, H-3); 2,38 (3H, *s*l, CH₃-9); 2,34 (2H, *t*, $J_{11,12} = 7,3$ Hz, CH₂-11); 1,58 (2H, *m*, CH₂-12); 1,26 (8H, *m*, CH₂-13 a CH₂-16); 0,84 (3H, *m*, CH₃-17).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, DMSO): 172,0 (C-10); 160,0 (C-2); 153,6 (C-8A); 153,0 (C-4); 142,7 (C-7); 125,8 (C-5); 115,0 (C-6); 114,7 (C-4A); 112,0 (C-3); 105,4 (C-8); 36,5 (C-11); 31,1 (C-15); 28,5*(C-14); 28,4*(C-13); 24,8 (C-12); 22,0 (C-16); 17,9 (C-9); 13,9 (C-17).

(* Sinais interconvertíveis)

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 301 [M]⁺ (24), 217 (11), 175 [M-C₈H₁₄O]⁺ (100), 147 (78), 119 (9).

II.3.5. Reacções de redução de *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) a 4-metil-7-(octilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**48**)

Procedimento geral

A uma solução de *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) em tetra-hidrofurano (THF) seco foi adicionado o agente redutor à temperatura de 0 °C. Após a adição, a mistura reaccional foi colocada à temperatura ambiente ou a refluxo com agitação em atmosfera inerte. A reacção foi seguida por c.c.f utilizando como sistema de eluentes a mistura diclorometano/metanol (10/0,3) (V/V), e como reveladores o iodo e KMnO₄ seguido de aquecimento (Tabela 3).

Nas reacções em que participaram o LiAlH₄ e o C₄H₈O-BH₃ como agentes redutores, no final da reacção procedeu-se à adição, gota a gota, de água destilada à mistura reaccional, seguida da filtração, da extracção com éter etílico, da secagem com sulfato de sódio anidro e da concentração a pressão reduzida, tendo sido observada a formação de uma mistura complexa.

Na reacção em que se utilizou o (CH₃)₂S-BH₃ como agente redutor, a mistura reaccional foi tratada com solução de hidróxido de sódio (5%) em banho de gelo, seguida da neutralização com solução de

ácido clorídrico (5%). Procedeu-se à extracção com diclorometano, à secagem com sulfato de sódio anidro e à concentração a pressão reduzida, tendo sido observada uma mistura complexa.

Tabela 3 - Reacções de redução de *N*-(4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**47**) utilizando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1	2	3	4	5	6
Material de partida (mg; mmol)	(19; 0,063)	(20; 0,066)	(10; 0, 033)	(41,3; 0,137)	(41,3; 0,137)	(50,4; 0,167)
Agente redutor (mg ou μL; mmol)	LiAlH₄ (8,9; 0,234)	LiAlH₄ (11,9; 0,314)	C₄H₉O-BH₃ (132; 0,132)	(CH₃)₂S-BH₃ (38,5; 0,411)	(CH₃)₂S-BH₃ (38,5; 0,411)	(CH₃)₂S-BH₃ (77,6; 0,835)
Solvente (mL)	THF (1)	THF (3,5)	THF (2)	THF (2)	THF (2)	THF (3)
Temperatura (°C)	refluxo	refluxo	T. amb.	T. amb.	refluxo	T. amb.
Tempo de reacção (h)	3	3	48	24	3	24
Resultado	Mistura complexa	Mistura complexa	Mistura complexa	Mistura complexa	Mistura complexa	Mistura complexa

II.3.6 Reacção de aminação redutiva de 7-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**43**)

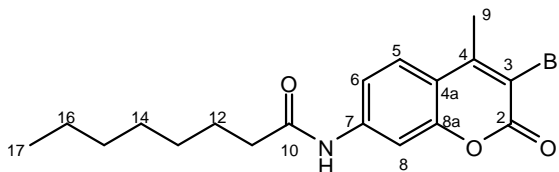
Procedimento geral

A uma solução de 7-amino-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (**43**) em etanol seco foi adicionado hexanal à temperatura ambiente. De seguida, a mistura foi colocada a refluxo, com agitação em atmosfera inerte e 24h e depois foi adicionado o agente redutor. A reacção foi seguida por c.c.f utilizando como sistema de eluentes a mistura n-hexano/acetato de etilo (4/2) (V/V). A mistura permaneceu a refluxo, com agitação e em atmosfera inerte. A mistura reaccional foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio (10%), lavada com água e extraída com diclorometano e éter etílico. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio e evaporada a pressão reduzida.^{133,109}

Tabela 4 - Reacções de aminação redutiva de 7-amino-4-metil-2H-cromen-2-ona (**43**) utilizando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1	2	3
Material de partida (mg; mmol)	(50 ; 0,285)	(54,8; 0,312)	(25,4; 0,145)
Hexanal (μL; mmol)	(45,9; 0,371)	(77; 0,623)	(23,3; 0,188)
Ácido acético glacial (mL)	(1)	(5)	---
Agente redutor (mg; mmol)	NaBH ₃ CN (35,8; 0,570)	NaBH ₃ CN (156,8; 2,496)	NaBH ₄ (14,9; 0,393)
Solvente (mL)	EtOH (8)	---	EtOH (5)
Temperatura (°C)	refluxo	refluxo	T. amb.
Tempo de reacção (h)	24	48	48
Resultado	Mistura complexa	Mistura complexa	Não houve formação de produto

II.3.7 Síntese de *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**55**)



A uma solução de *N*-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**47**) (323,7mg; 1,075 mmol) em clorofórmio (16,5 mL), foi adicionado, em atmosfera inerte, bromo (71,6 μL; 1,40 mmol), à temperatura inicial de 0 °C.¹¹¹ A mistura prosseguiu em agitação à temperatura ambiente e em atmosfera inerte durante 17 horas. Adicionou-se trietilamina (0,719 mL; 5,16 mmol) e deixou-se em agitação durante cerca de 30 minutos. A reacção foi seguida por c.c.f. usando como eluente a mistura (CHCl₃/éter etílico) (6/4) (V/V) e as placas visualizadas a λ=254 e 366 nm. A mistura reaccional foi neutralizada com uma solução de ácido clorídrico (1 M) e lavada com água destilada. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e evaporada a pressão reduzida. De seguida o resíduo foi lavado com *n*-hexano de modo a remover impurezas apolares e filtrado. Sempre que necessário, o produto foi isolado por cromatografia de coluna em sílica gel usando como eluente misturas de polaridade crescente de (*n*-hexano/diclorometano) e de (diclorometano/éter etílico) tendo sido obtida a *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**55**) com um rendimento de 84,2% sob a forma de sólido amorfo branco apresentando:

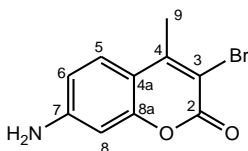
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3317 (NH), 2950, 2922, 2855 (CH), 1690 (C=O), 1608, 1565, 1521 (C=C), 1411 (CH), 1168 (C-O), 611 (C-Br).

^1H RMN δ (400 MHz, DMSO): 10,35 (1H, *s*, NH); 7,78 (1 H, *d*, $J_{8,6} = 2,0$ Hz, H-8); 7,78 (1H, *dl*, $J_{5,6} = 8,4$ Hz, H-5); 7,47 (1H, *dd*, $J_{6,5} = 8,0$ Hz e $1,6$ Hz, H-6); 2,54 (3H, *s*, CH_3 -9); 2,34 (2H, *t*, $J = 7,4$ Hz, CH_2 -11); 1,58 (2H, *m*, CH_2 -12); 1,27 (8H, *m*, CH_2 -13 a CH_2 -16); 0,84 (3H, *m*, CH_3 -17).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, DMSO): 172,1 (C-10); 156,4 (C-2); 151,6 (C-8A); 153,0 (C-4); 142,8 (C-7); 126,5 (C-5); 115,5 (C-6); 114,4 (C-4A); 109,5 (C-3); 105,1 (C-8); 36,5 (C-11); 31,1 (C-15); 28,6*(C-13); 28,4*(C-14); 24,8 (C-12); 22,0 (C-16); 19,2 (C-9); 13,9 (C-17).

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 380/382 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (50:45) 359 (15), 301 (10), 201 (100), 185 (21), 147 (25).

II.3.8 Preparação de 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**)



Método 1¹¹⁰

A uma solução de 7-amino-4-metil-2H-cromen-2-ona (**43**) (50 mg; 0,285 mmol) em diclorometano (5 mL) foram adicionados 1,5 equivalentes de oxono (131,4 mg; 0,428 mmol) e 2,8 equivalentes de brometo de hidrogénio (0,399 mL de uma solução aquosa 2M; 0,798 mmol). A mistura prosseguiu em agitação à temperatura ambiente e em atmosfera inerte durante 48 horas. Adicionou-se trietilamina (0,120 mL; 0,86 mmol) e deixou-se em agitação durante cerca de 12 horas. A reacção foi seguida por c.c.f. usando como eluente a mistura (CHCl_3 /éter etílico) (6/4) (V/V) e as placas visualizadas a $\lambda = 254$ e 366 nm, tendo sido observada a formação de uma mistura complexa.

Método 2

A uma solução de N-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**55**) (197,3 mg; 0,519 mmol) em dioxano (53 mL) foi adicionada uma solução de ácido sulfúrico a 10% (46 mL) à temperatura ambiente. A reacção foi colocada a refluxo (a 104°C) durante 24 h. A reacção foi seguida por c.c.f. (*n*-

hexano/acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas foram visualizadas a UV ($\lambda = 254$ e a $\lambda = 360$ nm). A mistura reaccional foi lavada com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio saturada (até pH~6) e com água tendo sido extraída com acetato de etilo e *n*-butanol (15 mL 80/20 (V/V)). A fase orgânica foi seca e evaporada a pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel (diclorometano) tendo sido obtida a 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) sob a forma de um filme esverdeado com um rendimento de 66,7 % apresentando:

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3456 (NH), 3359 (NH), 2924 (CH), 1694 (C=O), 1615, 1528 (C=C), 1209 (C-O), 686 (C-Br).

^1H RMN δ (400 MHz, DMSO): 7,50 (1 H, *d*, $J_{5,6} = 8,7$ Hz, H-5); 6,58 (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,8$ Hz, H-6); 6,41 (1H, *sl*, H-8); 6,25 (2H, *sl*, NH_2); 2,53 (3H, *sl*, CH_3 -9).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, DMSO): 156,9 (C-2); 153,4 (C-8A); 153,9 (C-4); 152,4 (C-7); 127,0 (C-5); 111,8 (C-6); 108,6 (C-4A); 104,0 (C-3); 98,1 (C-8); 19,1 (C-9).

II.3.9 Preparação de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**52**) e de 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (**53**)

Método 1¹¹⁴

A uma solução de 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (54,8 mg; 0,216 mmol) (**54**) em 1,2-diclorobenzeno (10 mL) foram adicionados 3 equivalentes de 4-iodoanisole (151,4 mg; 0,647 mmol), 10,7 mol% de iodeto de cobre (4,5 mg ; 0,023 mmol), 10,7 mol% de 1,10-fenantrolina (4,2 mg; 0,023 mmol) e *ter*-butóxido de potássio KO*t*-Bu (72,6 mg; 0,647 mg). A mistura ficou a refluxo com agitação em atmosfera inerte (cerca de 148 h). A reacção foi seguida por c.c.f (CHCl_3 /éter etílico) (8/2) e as placas foram visualizadas a $\lambda=254$ e 366 nm, não se tendo observado a formação de produto (Tabela 5, condição reaccional 1).

Método 2¹¹⁵

A uma solução de 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (62,2 mg; 0,245 mmol) (**54**) em 1,2-diclorobenzeno (11 mL) foram adicionados 3 equivalentes de 4-iodoanisole (172,0 mg; 0,735 mmol), 3

equivalentes de carbonato de potássio anidro (101,6 mg; 0,735 mmol), 3 equivalentes de cobre previamente tratado,¹³⁴ e 0,3 equivalentes de éter de coroa 18-crown-16 (19,4 mg; 0,0735 mmol). A mistura ficou a refluxo com agitação em atmosfera inerte (cerca de 148 h). A reacção foi seguida por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas foram visualizadas a $\lambda = 254$ e 366 nm, não se tendo observado a formação de produto (Tabela 5, condição reaccional 2).

Método 3¹¹⁶

A uma solução de 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (55,5 mg; 0,218 mmol) (**54**) em *o*-xileno seco foi adicionado, em atmosfera inerte 4-iodoanisole (56,1 mg; 0,238 mmol), *ter*-butóxido de potássio (26,7 mg; 0,238 mmol), acetato de paládio (1,22 mg; 0,0054 mmol), e *ter*-butil fosfina. A reacção foi colocada a refluxo e mantida com agitação em atmosfera inerte durante 48 horas. A reacção foi seguida por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas foram visualizadas a $\lambda = 254$ e 366 nm, tendo sido observada a formação de uma mistura complexa (Tabela 5, condição reaccional 3).

Método 4

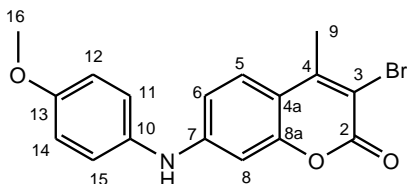
A um balão de duas tubuladuras purgado cerca de 20 minutos com um fluxo de azoto foi adicionada base e um volume de solvente seco. Adicionaram-se sucessivamente o ligando, o catalisador de paládio e o 4-iodoanisole. Finalmente foi adicionada a 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**). O sistema foi purgado com azoto cerca de 5 minutos após cada adição. A mistura ficou a refluxo com agitação em atmosfera inerte durante 48 horas até o material de partida ser consumido. A reacção foi seguida por TLC (*n*-hexano/acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas foram visualizadas a $\lambda = 254$ e 366 nm. A mistura reaccional foi concentrada a pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna gravítica em sílica gel utilizando o clorofórmio como eluente. Destas separações resultaram a 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**52**) e a 3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2H-cromen-2-ona (**53**) (Tabela 5, condições reaccionais 4, 5 e 6).

Parte Experimental

Tabela 5 – Reações de acoplamento da 7-amino-3-bromo-4-metil-2H-cromen-2-ona (**54**) utilizando diferentes condições reaccionais

Condições reaccionais	1	2	3	4	5	6
Material de partida (mg; mmol)	(54,8; 0,216)	(62,2; 0,245)	(55,5 mg; 0,218)	(21,5; 0,085)	(19,1; 0,075)	(87,8; 0,346)
4-iodoanisole (mg; mmol)	(151,4; 0,647)	(172,0; 0,735)	(56,1; 0,238)	(39,8; 0,170)	----	(162; 0,692)
Iodobenzeno (μL; mmol)	----	----	----	----	(16,8; 0,150)	----
Base (mg; mmol)	KO-t-Bu (72,6; 0,647)	K ₂ CO ₃ (101,6; 0,735)	KO-t-Bu (26,7; 0,238)	Cs ₂ CO ₃ (83,1; 0,255)	Cs ₂ CO ₃ (49; 0,150)	Cs ₂ CO ₃ (225,5; 0,692)
Catalisador de Cu/ Pd (mg; mmol)	CuI (4,5; 0,023)	Cu (46,7; 0,735)	Pd(OAc) ₂ (1,22 ; 0,0054)	Pd(OAc) ₂ (1,9; 0,0085)	Pd(Fe ₃ O ₄) (19 mg)	Pd(Fe ₃ O ₄) (84 mg)
Ligando (mg/μL; mmol)	1,10-fenantrolina (4,2; 0,023)	Éter 18-crown-16 (19,4, 0,0735)	P(t-Bu) ₃ (21,7; 0,0218)	Xantphos (2,2; 0,0085)	Xantphos (2,2; 0,0038)	Xantphos (10; 0,0173)
Solvente (mL)	1,2-C ₆ H ₄ Cl ₂ (10)	1,2-C ₆ H ₄ Cl ₂ (11)	<i>o</i> -xileno (15)	Dioxano	Dioxano	Dioxano
Temperatura (°C)	180	180	120	104	104	104
Tempo de reacção (h)	48	48	48	120	144	192
Resultado	Não houve formação de produto	Não houve formação de produto	Mistura complexa	Reacção incompleta	Reacção incompleta	Reacção incompleta
Produtos 52/53 (η%)	----	----	----	25/22	--/64	9/10

3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**52**) obtido na forma de filme amarelo com um rendimento de 25% utilizando as condições reaccionais 4 (Tabela 5)



UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH): 385 ($\epsilon=9680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

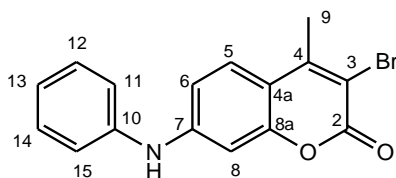
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3343 (NH), 2957, 2924, 2852 (CH), 1713 (C=O), 1622, 1593, 1512 (C=C), 1171 (C-O), 666 (C-Br).

¹H RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 7,46 (1 H, *d*, $J_{5,6} = 8,0 \text{ Hz}$, H-5); 7,17 (2H, *J* = 8,0 Hz, H-11 e H-15); 6,94 (2H, *d*, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H-12 e H-14); 6,76 (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,0 \text{ Hz}$, H-6); 6,75 (1H, *sl*, H-8); 3,85 (3H, *sl*, CH₃-16); 2,57 (3H, *sl*, CH₃-9).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, CDCl_3): 158,5 (C-2); 157,8 (C-8A); 154,1 (C-13); 151,3 (C-4); 149,6 (C-7); 132,5 (C-10); 126,2 (C-5); 124,8 (C-11 e C-15); 114,9 (C-12 e C-14); 114,3 (C-4A e C-6); 111,9 (C-3); 99,9 (C-8); 55,6 (C-16) 19,3 (C-19).

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 281 $[(\text{M}+\text{H})-\text{Br}]^+$ (51), 266 $[(\text{M}+\text{H})-\text{Br}-\text{CH}_3]^+$ (50), 251 $[(\text{M}+\text{H})-\text{Br}-\text{OCH}_3+\text{H}]^+$ (100), 238 $[(\text{M}+\text{H})-\text{Br}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$, (11), 223 $[(\text{M}+\text{H})-\text{Br}-\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_3]^+$ (83).

3-bromo-4-metil-7-(fenilamino)-2*H*-cromen-2-ona (**53**) obtido na forma de filme amarelo com um rendimento de 22% utilizando as condições reacionais 4 (Tabela 5)



UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH): 384 ($\epsilon=9630 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3305 (NH), 2963 (CH), 1706 (C=O), 1629, 1594, 1523 (C=C), 1261 (C-O), 697 (C-Br).

^1H RMN δ (400 MHz, CDCl_3): 7,50 (1 H, *d*, $J_{5,6} = 8,7 \text{ Hz}$, H-5); 7,39 (2H, *t*, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H-12, H-14); 7,22 (2H, *d*, $J = 7,6 \text{ Hz}$, H-11, H-15); 7,14 (1H, *t*, $J = 7,4 \text{ Hz}$, H-13); 6,91 (1H, *dd*, $J_{6,5} = 8,7 \text{ Hz}$, $J_{6,8} = 2,1 \text{ Hz}$, H-6); 6,95 (1H, *d*, $J_{8,6} = 2,0 \text{ Hz}$, H-8); 2,59 (3H, *s*, CH_3 -9).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, CDCl_3): 19,3 (C-9); 101,2 (C-8); 108,2 (C-3); 112,4 (C-4A); 112,9 (C-6); 121,0 (C-11); 121,0 (C-15); 124,0 (C-13); 126,2 (C-5); 129,7 (C-12); 129,7 (C-14); 140,0 (C-10); 147,9 (C-7); 151,2 (C-4); 153,9 (C-8A); 157,7 (C-2).

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 331/329 $[\text{M}]^+$ (16:16), 251 $[\text{M}-\text{Br}+\text{H}]^+$ (95), 231 (100), 223 $[\text{M}-\text{Br}-\text{CO}+\text{H}]^+$ (64), 202 (30), 132 (50), 104 (41).

II.3.10 Reacção de alquilação de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (52)

A uma solução de 3-bromo-7-(4-metoxifenilamino)-4-metil-2*H*-cromen-2-ona (52) (9,6 mg; 0,027 mmol) em acetonitrilo seco (5 mL) foi adicionado carbonato de cézio (17,4 mg; 0,053 mol) e excesso de iododecano (36 μ L; 0,168 mmol). A mistura ficou em agitação durante uma semana a 80 °C. A reacção foi seguida por c.c.f. (n-hexano/ acetato de etilo) (4/2) (V/V) e as placas visualizadas a λ = 254 e 366 nm. A mistura reaccional foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida tendo sido observada a formação de uma mistura complexa.¹³⁵

II.3.11. Preparação de *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (57)

Procedimento Geral

A uma solução de *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (55) em solvente seco (10 mL), adicionou-se base (10 mL) à temperatura de 50 °C. À temperatura de 75 °C foram adicionados o catalisador de paládio, o iodeto de cobre CuI e o ligando. Uma hora depois da mistura reaccional ter atingido o refluxo juntou-se o prop-2-in-1-ol. A reacção ficou a refluxo, em atmosfera inerte durante 24 horas sendo seguida por c.c.f. (CHCl₃/éter etílico) (6/4) (V/V) e as placas foram visualizadas sob radiação UV (λ = 366 nm). A mistura reaccional foi evaporada utilizando uma *pre-trap*. O produto foi isolado por cromatografia de coluna em sílica gel (CHCl₃/éter 95/5), tendo sido obtida a *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (57) (Tabela 6).

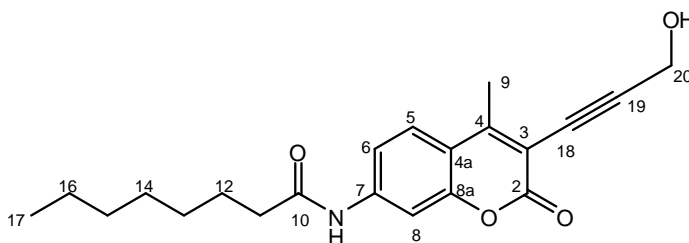
Parte Experimental

Tabela 6 -Reacções de acoplamento de Sonogashira-Hagihara da *N*-(3-bromo-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**55**) com prop-2-in-1-ol utilizando diferentes condições reaccionais.

Condições reaccionais	1	2	3	4	5	6	7
Material de partida (mg; mmol)	(50,0; 0,131)	(50,0; 0,131)	(100,4; 0,264)	(100,4; 0,264)	(100,4; 0,264)	(100,1; 0,263)	(100,1; 0,263)
Prop-2-in-1-ol (μL; mmol)	(12; 0,207)	(12; 0,207)	(23; 0,395)	(57,5; 0,988)	(57,5; 0,988)	(23; 0,395)	(57,5; 0,988)
Base (mL)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	DIPA (10)	TEA (10)
Catalisador de Pd (mg; mmol)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (4,6; 0,007)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (4,6; 0,007)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (9,2; 0,013)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (23,1; 0,033)	Pd(PPh ₃) ₄ (38,1; 0,033)	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (23,1; 0,033)	Pd(PPh ₃) ₄ (38,1; 0,033)
Co-catalisador de Cu (mg; mmol)	CuI (2,5; 0,013)	CuI (2,5; 0,013)	CuI (5,0; 0,026)	CuI (12,6; 0,066)	CuI (12,6; 0,066)	CuI (12,6; 0,066)	CuI (12,6; 0,066)
Ligando (mg; mmol)	PPh ₃ (6,9; 0,026)	PPh ₃ (6,9; 0,026)	PPh ₃ (13,8; 0,053)	PPh ₃ (34,5; 0,132)	PPh ₃ (34,5; 0,132)	PPh ₃ (34,5; 0,132)	PPh ₃ (34,5; 0,132)
Solvente (mL)	DMF (4)	Dioxano (10)	THF (10)	THF (10)	THF (10)	THF (10)	THF (10)
Temperatura (°C)	153	104	90	90	90	90	90
Tempo de reacção (h)	24	24	24	24	24	24 h	24 h
Resultado	---	Reacção incompleta	Reacção completa	Reacção completa	Reacção completa	Reacção incompleta	Reacção incompleta
Rendimento (η%)	---	12	20	31	40	---	---

DIPA-di-isopropilamina; TEA-trietilamina; DMF - dimetilformamida.

N-(3-(3-hidroxi-1-prop-1-inoil)-4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)octanamida (**57**) obtida na forma de filme bege com um rendimento de 40% utilizando as condições reaccionais 5 (Tabela 6).



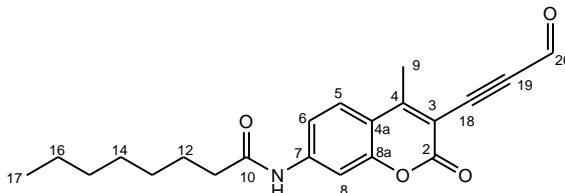
IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (filme) cm^{-1} : 3398 (OH), 3314 (NH), 3289 (NH), 2921 (CH), 2853 (CH), 2280 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1694 ($\text{C}=\text{O}$), 1666 ($\text{C}=\text{O}$), 1610 ($\text{C}=\text{C}$), 1568 ($\text{C}=\text{C}$), 1530 ($\text{C}=\text{C}$), 1430 (CH), 1167 (C-O).

^1H RMN δ (400 MHz, DMSO): 10,33 (1H, *sl*, NH); 7,76 (1 H, *sl*, H-8); 7,74 (1H, *dl*, $J_{5,6} = 8,8$ Hz, H-5); 7,48 (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,8$ Hz, H-6); 2,56 (3H, *sl*, CH_3 -9); 2,34 (2H, *t*, $J = 7,3$ Hz, CH_2 -11); 1,59 (2H, *m*, CH_2 -12); 1,26 (8H, *m*, CH_2 -13 a CH_2 -16); 0,84 (3H, *m*, CH_3 -17).

¹³C-RMN δ (100 MHz, DMSO): 13,9 (C-17); 17,0 (C-9); 22,0 (C-16); 24,8 (C-12); 28,4*(C-14); 28,5*(C-13); 31,1* (C-15); 36,5 (C-11); 105,1 (C-8); 107,2 (C-3); 114,3 (C-4A); 115,4 (C-6); 126,5 (C-5); 143,0 (C-7); 154,8 (C-4); 152,4 (C-8A); 158,7 (C-2); 172,1 (C-10).

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 355 [M]⁺ (14), 339 (17), 229 (54), 213 (100), 200 (36), 173 (14).

II.3.12 Preparação de *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**)



Método 1

A uma solução de dióxido de manganês (327 mg; 3,762 mmol) em diclorometano seco (4 mL) foi adicionada uma solução de *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**57**) em diclorometano seco. A mistura reaccional permaneceu com agitação, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃/éter etílico) (6/4) (V/V) e as placas foram visualizadas após pulverização com um spray de DNP (dinitrofenil-hidrazina). Após 3 horas a mistura foi filtrada, extraída com diclorometano, seca com sulfato de magnésio e concentrada a pressão reduzida, tendo observada a presença do produto pretendido num quantidade vestigial.

Método 2

A uma solução do agente oxidante (1,1,1-triacetoxi)-1,1-di-hidro-1,2-benzodioxol-3-(1*H*)-ona (periodinona Dess-Martin) (186,9 mg; 0,437 mmol) em diclorometano seco (2 mL) adicionou-se, à temperatura ambiente, uma solução *N*-(3-(3-hidroxiprop-1-inil)-4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**57**) (51,7 mg; 0,146 mmol) em diclorometano (8 mL). A reacção prosseguiu à temperatura ambiente, em atmosfera inerte durante 20 horas, com agitação. Diluiu-se a mistura reaccional com diclorometano e adicionou-se uma solução saturada de NaHCO₃ contendo Na₂S₂O₃ (2,5 g). A mistura ficou em agitação cerca de 5 minutos. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com diclorometano e éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e evaporada a pressão reduzida. O produto foi isolado por cromatografia em coluna sob pressão de azoto em sílica gel desactivada a 10% (CHCl₃/éter) (95/5) (V/V), tendo sido obtida a *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-

oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**) sob a forma de um sólido amorfo amarelo com um rendimento de 63,8%.

IV $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} : 3351 (NH), 2924 (CH), 2853 (CH), 2182 (C \equiv C), 1705 (C=O), 1657 (C=O), 1615 (C=C), 1548 (C=C), 1502 (C=C), 1428 (CH), 1166 (C-O).

^1H RMN δ (400 MHz, DMSO): 10,47 (1H, *sl*, NH); 7,85 (1H, *dl*, $J_{5,6} = 9,2$ Hz, H-5); 7,79 (1 H, *sl*, H-8); 7,50 (1H, *dl*, $J_{6,5} = 8,4$ Hz, H-6); 2,65 (3H, *sl*, CH₃-9); 2,36 (2H, *t*, $J = 7,4$ Hz, CH₂-11); 1,58 (2H, *m*, CH₂-12); 1,27 (8H, *m*, CH₂-13 a CH₂-16); 0,85 (3H, *m*, CH₃-17).

^{13}C -RMN δ (100 MHz, DMSO): 172,3 (C-10); 161,3 (C-2); 152,4 (C-8A); 153,5 (C-4); 143,1 (C-7); 127,5 (C-5); 115,6 (C-6); 114,0 (C-4A); 104,2 (C-3); 105,1 (C-8); 36,2 (C-11); 30,8 (C-15); 28,1*(C-13); 28,3*(C-14); 24,5 (C-12); 21,7 (C-16); 17,2 (C-9); 13,8 (C-17).

GC-TOF EIMS m/z (int.rel.): 353 [M]⁺ (14), 227 [M-C₈H₁₄O]⁺ (100), 199 [M-C₈H₁₄O-CO]⁺ (33), 171 [M-C₈H₁₅O-CO-CO]⁺ (17).

II.3.13 Reacção de hidrólise de *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**)

Método 1

A uma solução de *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**) (67,4 mg; 0,191 mmol) em dioxano (19 mL) foi adicionada uma solução de ácido clorídrico 1M (8,7 mL) à temperatura ambiente. A reacção foi colocada a refluxo (a 104 °C) durante 4 h. A reacção foi seguida por c.c.f. (clorofórmio/éter etílico) (6/4) (V/V) e as placas foram visualizadas a UV ($\lambda = 254$ e 366 nm). A mistura reaccional foi lavada com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio saturada (até pH~6) e com água tendo sido extraída com acetato de etilo e *n*-butanol (15 mL 80/20 (V/V)). A fase orgânica foi seca e evaporada a pressão reduzida, tendo sido observada a formação de uma mistura complexa.

Método 2

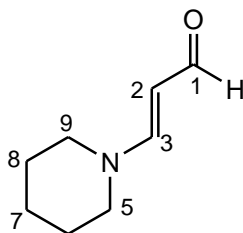
A uma solução de *N*-(4-metil-2-oxo-3-(3-oxoprop-1-inil)-2*H*-cromen-7-il)octanamida (**58**) (38,9 mg; 0,110 mmol) em dioxano (5 mL) foi adicionada uma solução de ácido sulfúrico a 10% (10 mL) à

temperatura ambiente. A reacção foi colocada a refluxo (a 104 °C) durante 4 h. A reacção foi seguida por c.c.f. (corofórmio/éter etílico) (6/4) (V/V) e as placas foram visualizadas a UV ($\lambda=254$ e a $\lambda=360$ nm). A mistura reaccional foi lavada com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio saturada (até pH~6) e com água tendo sido extraída com acetato de etilo e *n*-butanol (15 mL 80/20 (V/V)). A fase orgânica foi seca e evaporada a pressão reduzida, tendo sido observada a formação de uma mistura complexa.

II.3.14 Tentativa de síntese de ácido (Z)-2-cianopent-2-en-4-óico (61)

Método 1

A uma solução de dimetilsulfóxido (575 μ L; 8,1 mmol) em diclorometano seco (7 mL) foi adicionado cloreto de pivaloílo (665 μ L; 5,4 mmol) em diclorometano seco (5 mL). A mistura reaccional foi arrefecida a -80 °C e 15 minutos depois foi adicionada uma solução de prop-2-in-1-ol (155 μ L; 2,7 mmol) em diclorometano (2 mL) gota a gota. A mistura reaccional permaneceu a -80 °C e 1 hora depois foi adicionada trietilamina (1,88 mL; 13,5 mmol). A mistura ficou em agitação a -80 °C durante 1 hora e depois foi colocada à temperatura ambiente durante 30 minutos. De seguida foram adicionados ácido cianoacético (689 mg; 8,1 mmol) e piperidina (800 μ L; 8,1 mmol). A mistura reaccional foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio, com solução saturada da cloreto de amónia (NH₄Cl).e extraída com diclorometano. O produto foi isolado por cromatografia de coluna em sílica gel (acetato de etilo/metanol) (V/V)., tendo sido isolado o (E)-3-piperidin-1-il)acrilaldeído (**62**) com um rendimento de 6 %.



¹H RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9,06 (1H, *d*, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, H-1); 6,98 (1H, *d*, $J_{3,2} = 12,0$ Hz, H-3); 5,22 (1 H, *dd*, $J_{2,3} = 12,0$ Hz, $J_{6,5} = 8,0$ Hz, H-2); 3,35(2H, *sl*, CH₂-5); 3,26(2H, *sl*, CH₂-9);1,67 (6H, *m*, CH₂-6 a CH₂-8).

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 189,7 (C-1); 159,4 (C-3); 100,7 (C-2); 55,0 (C-9); 46,3 (C-5); 23,9 (C-6);); 23,9 (C-7);); 23,9 (C-8).

- ¹ Grätzel, M. (2009) *Recent advances in sensitized mesoscopic solar cells*, Acc. Chem. Res., 42, 1788-1798.
- ² Mishra, A., Fischer, M.K.R., Bäuerle, P. (2009) *Metal-free Organic dyes for dye-sensitized solar cells: from structure: property relationships to design rules*, Angew. Chem. Int. Ed., 48, 2474-2499.
- ³ Yum, J.H., Chen, P., Grätzel, M., Nazeeruddin, M.K. (2008) *Recent developments in Solid-state Dye-sensitized solar cells*, ChemSusChem, 1, 699-707.
- ⁴ Wang, Z.S., Liu, F. (2010) *Structure-property relationships of organic dyes with D- π -A structure in dye-sensitized solar cells*, Front. Chem. China, 5(2), 150-161.
- ⁵ Zaban, A, Ferrere, S., Gregg, B.A. (1998) *Relative energetic at the semiconductor/sensitizing dye/electrolyte interface*, J. Phys. Chem. B, 102, 452-460.
- ⁶ Hara, K., Sato, T., Katoh, R., Furube, A., Ohga, Y., Shinpo, A., Suga, S., Sayama, K., Sugihara, H., Arakawa, H. (2003) *Molecular design of coumarin dyes for efficient dye-sensitized solar cells*, J. Phys. Chem B, 107, 597-606.
- ⁷ Park, N. (2010). *Light management in dye-sensitized solar cell*, Korean Journal of Chemical Engineering, 27(2), 375–384. doi:10.1007/s11814-010-0112-z.
- ⁸ Sequeira, S. I. H. (2012) *Células Solares Sensibilizadas por novos Corantes Derivados de Cumarinas*, Dissertação de Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente (FCUL).
- ⁹ Furube, A., Katoh, R., Hara, K., Sato, T., Murata, S., Arakawa, H., Tachiya, M. (2005) *Lithium ion effect on electron injection from a photoexcited coumarin derivative into a TiO₂ nanocrystalline film investigated by Visible-to-IR ultrafast spectroscopy*, J. Phys. Chem. B, 109, 16404-16414.
- ¹⁰ Rehm, J.M., McLendon, G.L., Nagasawa, Y., Yoshihara, K., Moser, J., Grätzel, M. (1996) *Femtosecond electron-transfer dynamics at a sensitizing dye-semiconductor (TiO₂) interface*, J. Phys. Chem, 9577-9578.
- ¹¹ Vougioukalakis, G. C., Philippopoulos, A. I., Stergiopoulos, T., & Falaras, P. (2010) *Contributions to the development of ruthenium-based sensitizers for dye-sensitized solar cells*, Coordination Chemistry Reviews, 255, 2602–2621.
- ¹² Kitamura, T., Ikeda, M., Shigaki, K., Inoue, T., Anderson, N.A., Ai, X., Lian, T., Yanagida, S. (2004) *Phenyl-conjugated oligoene sensitizers for TiO₂ solar cells*, Chem. Mater., 16, 1806-1812.
- ¹³ Giribabu, L., Kanaparthi, R.K., Velkannan, V. (2012) *Molecular engineering of sensitizers for dye-sensitized solar cell applications*, The Chemical Record, 12, 306-328.

- ¹⁴ Gerischer, H., Michel-Beyerle, M.E., Rebentrost, F., Tributsch, H. (1968) *Sensitization of charge injection into semiconductors with large band gap*, *Electrochimica Acta*, 13, 1509-1515.
- ¹⁵ Kanaparthi, R.K., Kandhadi, J., Giribabu, L. (2012) *Metal-free organic dyes for dye-sensitized solar cell: recent advances*, *Tetrahedron*, 68, 306-328.
- ¹⁶ Hagfeldt, A., Boschloo, G., Sun, L., Kloo, L., Pettersson, H. (2010) *Dye-sensitized solar cells*, *Chem. Rev.*, 110, 6595-6663.
- ¹⁷ O'Reagan, B., Grätzel, M. (1991) *A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films*, *Nature*, 353, 737-740.
- ¹⁸ Nazeeruddin, M.K., Kay, A., Rodicio, I., Humphry-Baker, R., Müller, E., Liska, P., Vlachopoulos, N., Grätzel, M. (1993) *Conversion of light to electricity by cis-X₂Bis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylate)ruthenium (II) charge-transfer sensitizers (X=Cl, Br, I, CN, and SCN) on nanocrystalline TiO₂ electrodes*, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 6382-6390.
- ¹⁹ Nazeeruddin, M.K., Zakeeruddin, S.M., Humphry-baker, R., Jirousek, M., Liska, P., Vlachopoulos, N., Shklover, Ficher, C.H., Grätzel, M. (1999) *Acid-base equilibria of (2,2'-bipyridil-4,4'-dicarboxylic acid) ruthenium (II) complexes and the effect of protonation on charge-transfer sensitization on nanocrystalline titania*, *Inorg. Chem.* 38, 6298-6305.
- ²⁰ Hara, K., Wang, Z.S., Sato, T., Furube, A., Katoh, R., Sugihara, H., Dan.oh, Y., Kasada, C. Shinpo, A., Suga, S. (2005) *Oligothiophene-containing coumarin dyes for efficient dye-sensitized solar cells*, *J. Phys. Chem. B*, 109, 15476-15482.
- ²¹ Nazeeruddin, M.K., Péchy, P., Renouard, T., Zakeeruddin, S.M., Humphry-Baker, R., Comte, P., Liska, P., Cevey, L., Costa, E., Shklover, V., Spiccia, L., Deacon, G.B., Bignozzi, C.A., Vlachopoulos, N., Grätzel, M. (2001) *Engineering of efficient panchromatic sensitizers for nanoGcrystalline TiO₂-based solar cells*, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1613-1624.
- ²² Wang, P., Zakeeruddin, S.M., Humphry-Baker, R., Moser, J.E., Grätzel, M. (2003) *Molecular-scale interface engineering of TiO₂ nanocrystals: improving the efficiency and stability of dye-sensitized solar cells*, *Adv. Mater.*, 15 (24), 2101-2104.
- ²³ Wang, P., Zakeeruddin, S.M., Exnar, I., Grätzel, M. (2002) *High efficiency dye-sensitized solar cells based on ionic polymer gel electrolyte*, *Chem. Commun.*, 2972-2973.
- ²⁴ Zakeeruddin, S.M., Nazeeruddin, Md.K., Humphry-Baker, R., Péchy, P., Quagliotto, P., Barolo, C., Viscardi, Grätzel, M. (2002) *Design, Synthesis, and applications of amphiphilic ruthenium polipyridil photosensitizers in solar cells based on nanocrystalline TiO₂ films*, *Langmuir*, 18, 952-954.

- ²⁵ Wang, P., Zakeeruddin, S.M., Moser, J.A., Humphry-Baker, R., Comte, P., Aranyos, V., Hagfeldt, A., Nazeeruddin, M.K., Grätzel, M. (2004) *Stable new sensitizer with improved light harvesting for nanocrystalline dye-sensitized solar cells*, Adv. Mater., 16, 1806-1811.
- ²⁶ Mishra, A., Pootrakulchote, N., Wang, M., Moon, S.J., Zakeeruddin, S.M., Grätzel, M., Bäuerle, P. (2011) *A thiophene-based anchoring ligand and its heteroleptic Ru(II)-complex for efficient thin-film dye-sensitized solar cells*, Adv. Funct. Mater., 21, 963-970.
- ²⁷ Yella, A., Lee, H.W., Tsao, H.N., Yi, C., Yi, C., Chandiran, A.K., Nazeeruddin, M.K., Diau, E.W.G., Yeh, C.Y., Zakeeruddin, S.M., Grätzel, M. (2011) *Porphyrin-sensitized solar cells with cobalt(II/III)-based redox electrolyte exceed 12 percent efficiency*, Science, 629-634.
- ²⁸ Grätzel, C., Zakeeruddin, S.M. (2013) *Recent trends in mesoscopic solar cells based on molecular and nanopigment light harvesters*, Materials Today, 16, 11-18.
- ²⁹ Hagberg, D.P., Marinado, T., Karlsson, K.M., Nonomura, K., Qin, P., Boschloo, G., Brinck, T., Hagfeldt, A., Sun, L. (2007) *Tuning the HOMO and LUMO energy levels of organic chromophores for dye sensitized solar cells*, J. Org. Chem., J. Org. Chem., 72, 9550-9556.
- ³⁰ Wang, Z.S., Hara, K., Dan-oh, Y., Kasada, C., Shinpo, A., Suga, S., Arakawa, H., Sugihara, H. (2005) *Photophysical and (photo)electrochemical properties of a coumarin dye*, J. Phys. Chem. B, 109, 3907-3914.
- ³¹ Wang, Z.S., Cui, Y., Dan-oh, Y., Kasada, C., Shinpo, A., Hara, K. (2008) *Molecular design of coumarin dyes for stable and efficient organic dye-sensitized solar cells*, J. Phys. Chem. C, 112, 17011-17017.
- ³² Ito, S., Miura, H., Uchida, S., Takata, M., Sumioka, K., Liska, P., Comte, P., Péchy, P., Grätzel, M. (2008) [*High-conversion-efficiency organic dye-sensitized solar cells with a novel indoline dye*](#), Chem. Commun., 2008, 5194-5196.
- ³³ Horiuchi, T., Miura, H., Uchida, S. (2003) *Highly-efficient metal-free organic dyes for dye-sensitized solar cells*, Chem. Commun., 3036-3037.
- ³⁴ Horiuchi, T., Miura, H., Sumioka, K., Uchida, S. (2004) *High Efficiency of Dye-Sensitized Solar Cells Based on Metal-Free Indoline Dyes*, J. Am. Chem. Soc., 126, 12218-12219.
- ³⁵ Hao, Y., Yang, X., Cong, J., Tian, H., Hagfeldt, A., Sun, L. (2009) *Efficient near infrared D- π -A sensitizers with lateral anchoring group for dye-sensitized solar cells*, Chem. Commun., 4031-433.
- ³⁶ Chen, R., Zhao, G., Yang, X., Jiang, X., Liu, J., Tian, H., Gao, Y., Liu, X., Han, K., Sun, M., Sun, L. (2008) *Photinduced intramolecular charge-transfer state in thiophene- π -conjugated donor-acceptor molecules*, J. Molec. Struct., 102-109.

- ³⁷ Zhang, G., Bala, H., Cheng, Y. Shi, D., Lv, X., Yu, Q., Wang, P. (2009) *High efficiency and stable dye-sensitized solar cells with an organic chromophore featuring a binary π -conjugated spacer*, Chem. Comm., 2198-2200.
- ³⁸ Karlsson, K.M., Jiang, X., Eriksson, S.K., Gabrielsson, E., Rensmo, H., Hagfeldt, A., Sun, L. (2011) *Phenoxazine dyes for dye-sensitized solar cells: relationship between molecular structure and electron lifetime*, Chem. Eur. J., 17, 6415-6424.
- ³⁹ Koumura, N., Wang, Z.S., Mori, S., Miyashita, M., Suzuki, E., Hara, K.J. (2008) *Alkyl-functionalized organic dyes for efficient molecular photovoltaics*, J. Am. Chem. Soc., 130, 4202-4203.
- ⁴⁰ Hara, K., Kurashige, M., Ito, S., Shinpo, A., Suga, S., Sayama, K., Arakawa, H. (2003) *Novel polyenes for highly efficient dye-sensitized solar cells*, Chem. Commun., 252-253.
- ⁴¹ Yao, Q.H., Shan, L., Li, F.Y., Yin, D.D., Wuang, C.H., (2003) *An expanded conjugation photosensitizer with two different adsorbing groups for solar cells*, New J. Chem., 27, 1277-1283.
- ⁴² Sayama, K., Tsukagoshi, S., Hara, K., Ohga, Y., Shinpou, A., Abe, Y., Suga, S., Arakawa, H. (2002) *Photoelectrochemical properties of J aggregates of benzothiazole merocyanine dyes on a nanostructured TiO₂ film*, J. Phys. Chem. B, 106, 1363-1371.
- ⁴³ Burke, A., Schmidt-Mende, L., Ito, S., Grätzel, M. (2007) *A novel blue dye for near-IR dye-sensitized solar cell applications*, Chem. Commun., 234-236.
- ⁴⁴ Li, C., Yum, J.H., Moon, S.J., Herrmann, A., Eickemeyer, F., Pschirer, N.G., Erk, P., Schneboom, J., Mullen, K., Grätzel, M., Nazeeruddin, M.K. (2008) *An improved perylene sensitizer for solar cell applications*, ChemSusChem, 1, 615-618
- ⁴⁵ Li, C., Yang, X., Chen, R., Pan, J., Tian, H., Zhu, H., Wang, X., Hagfeldt, A., Sun, L. (2007) *Anthraquinone dyes as photosensitizers for dye-sensitized solar cells*, Solar Energy Mater. Solar cells, 91, 1863-1871.
- ⁴⁶ Tanaka, K., Takimiya, K., Otsubo, T., Kawabuchi, K., Kajihara, S., Harima, Y. (2006) *Development and photovoltaic performance of oligothiophene-sensitized TiO₂ Solar cells*, Chem. Lett., 35, 592-593.
- ⁴⁷ Liu, X., Zhu, R., Zhang, Y., Liu, B., Ramakrishna, S. (2008) *Anionic benzothiazole containing polyfluorene and oligofluorene as organic sensitizers for dye-sensitized solar cells*, Chem. Commun., 3789-3791.
- ⁴⁸ Narayan, M.R. (2012) *Review: Dye sensitized solar cells based on natural photosensitizers*, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16, 208-215.
- ⁴⁹ Hara, K., Kurashige, M., Dan-oh, Y., Kasada, C., Shinpo, A., Suga, S., Sayama, K., Arakawa, H. (2003) *Design of new coumarin dyes having thiophene moieties for highly efficient organic-dye-sensitized solar cells*, New J. Chem., 27, 783-785.

- ⁵⁰ Hara, K., Tachibana, Y., Ohga, Y., Shinpo, A., Suga, S., Sayama, K., Sugihara, H., Arakawa, H. (2003) *Dye-sensitized nanocrystalline TiO₂ solar cells based on novel coumarin dyes*, Sol. Energy Mater. Sol. Cells, 77, 89-103.
- ⁵¹ Ito, S., Miura, H., Uchida, S., Takata, M., Sumioka, K., Liska, P., Comte, P., Péchy, P., Grätzel, M. (2008) *High-conversion-efficiency organic , dye-sensitized solar cells with a novel indoline dye*, Chem. Commun., 5194-5196.
- ⁵² Liu, X., Cole, J.M., Waddell, P.G., Lin, T.C., Radia, J., Zeidler, A. (2012) *Molecular origins of optoelectronic properties in coumarin dyes: toward designer solar cell and laser applications*, J., Phys. Chem. A, 116, 727-737.
- ⁵³ Wang, Z.S., Cui, Y., Hara, K., Dan-oh, Y., Kasada, Shinpo, A. (2007) *A high-light harvesting-efficiency coumarin dye for stable dye-sensitized solar cells*, Adv. Mater., 19, 1138-1141.
- ⁵⁴ Wang, Z.S., Cui, Y., Dan-oh, Y., Kasada, C., Shinpo, A., Hara, K. (2007) *Thiophene-functionalized coumarin dye for efficient dye-sensitized solar cells: electron lifetime improved by coadsorption of deoxycholic acid*, J. Phys. Chem. C, 111, 7224-7230.
- ⁵⁵ Ghosh, H.N., Asbury, J.B., Lian, T. (1998) *Direct observation of ultrafast electron injection from coumarin 343 to TiO₂ nanoparticles by femtosecond infrared spectroscopy*, J. Phys. Chem., 102, 6482-6486.
- ⁵⁶ Seo, K.D., Song, H.M., Lee, M.J., Pastore, M., Anselmi, C., De Angelis, F., Nazeeruddin, M.K., Grätzel, M., Kim, H.K. (2011) *Coumarin dyes containing low-band-gap chromophores for dye-sensitized solar cells*, Dyes and pigments, 90, 304-310.
- ⁵⁷ Choi, H., Baik, C., Kim, H.J., Kim, J.J., Song, K., Kang, S.O., Ko, J. (2007) *Synthesis of novel organic dyes containing coumarin moiety for solar cell*, Bull. Korean Chem. Soc., 28, 1973-1979.
- ⁵⁸ Alibabaei, L., Kim, J.H., Wang, M., Pootrakulchote, N., Teuscher, J., Di Censo, D., Humphry-Baker, R., Moser, J.E., Yu, Y.J., kay, K.Y., Zakeeruddin, S.M., Grätzel, M. (2010) *Molecular design of metal-free D- π -A substituted sensitizers for dye-sensitized solar cells*, Energy Environ. Sci., 3, 1757-1764.
- ⁵⁹ Czarnik, A.W. (1996) *Guest Editorial*, Acc. Chem. Res. 29, 112-113.
- ⁶⁰ Law, K.Y. (1993) *Organic photoconductive materials: recent trends and developments*, Chem. Rev., 93, 449-486.
- ⁶¹ Gospodinova, N., Terlemezyan, L. (1998) *Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline*, Prog. Polym. Sci., 23, 1443-1484.
- ⁶² Paul, G.K., Mwaura, J., Argun, A.A., Taranekar, P., Reynolds, J.R. (2006) *Cross-linked hyperbranched arylamine polymers as hole-transporting materials for polymer LEDs*, Macromolecules, 39, 7789-7792
- ⁶³ Hartwig, J.F. (2008) *Evolution of a fourth generation catalyst for the amination and thioetherification of aryl halides*, Acc. Chem. Res., 41, 1534-1544.

- ⁶⁴ Wolfe, J.P., Wagaw, S., Marcoux, J.F., Buchwald, S.L. (1998) *Rational development of practical for aromatic carbon-nitrogen bond formation*, Acc. Chem. Res. 31, 805-818.
- ⁶⁵ Hartwig, J.F. (1998) *Transition metal catalyzed synthesis of arylamines and aryl ethers from aryl halides and triflates: scope and mechanism*, Angew. Chem. Int. Ed., 37, 2046-2067.
- ⁶⁶ Kumada M. (1980) *Nickel and palladium complex catalysed cross-coupling reactions of organometallic reagents with organic halides*, Pure Appl. Chem., 1980, 52, 669-679.
- ⁶⁷ Stille, J. K. (2003) *The palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organotin reagents with organic electrophiles [New synthetic methods (58)]*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1986, 25, 508-524.
- ⁶⁸ Suzuki, A. (1991) *Synthetic studies via the cross-coupling reaction of organoboron derivatives with organic halides*, Pure Appl. Chem., 63, 419-422
- ⁶⁹ Negishi, E. (1982) *Palladium- or nickel-catalyzed cross coupling. A new selective method for carbon-carbon bond formation*, Acc. Chem. Res., 15, 340-348.
- ⁷⁰ Kosugi, M., Kameyama, M., Migita, T. (1983) *Palladium-catalyzed aromatic amination of aryl bromides with diethylamino-tributyltin*, Chem. Lett., 1983, 927-928.
- ⁷¹ Boger, L.D., Panek, J.S. (1985) *Total synthesis of lavendamycin methyl ester*, J. Org. Chem., 50, 5790-5795.
- ⁷² Guram, A.S., Buchwald, S.L. (1994) *Palladium-catalyzed aromatic aminations with in situ generated aminostannanes*, J. Am. Chem. Soc., 116, 7901-7902.
- ⁷³ Guram, A.S., Rennels, R.A., Buchwald, S.L. (1995) *A simple catalytic method for the conversion of aryl bromides to arylamines*, Angew. Chem. Int., Ed. Engl., 34, 1348-1348.
- ⁷⁴ Louie, J., Hartwig, J.F. (1995) *Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents*, Tetrahedron Lett., 36, 3609-3612.
- ⁷⁵ Wolfe, J.P., Buchwald, S.L. (1996) *Palladium-catalyzed amination of aryl iodides*, J. Org. Chem., 61, 1133-1135.
- ⁷⁶ Driver, M.S., Hartwig, J.F. (1996) *A second-generation catalyst for aryl halide amination: mixed secondary amines from aryl halides and primary amines catalyzed by (DPPF)PdCl*, J. Am. Chem. Soc., 118, 7217-7218.
- ⁷⁷ Wolfe, J.P., Wagaw, S., Buchwald, S.L. (1996) *An improved catalyst system for aromatic carbon-nitrogen bond formation: the possible involvement of bis(phosphine)palladium complexes as key intermediates*, J. Am. Chem. Soc., 118, 7215-7216.
- ⁷⁸ Van Leeuwen, P.W.N.M., Kamer, P.C.J., Reek, J.N.H. (1999) *The bite angle makes the catalyst*, Pure Appl. Chem., 71, 1443-1452.

- ⁷⁹ Wolfe, J.P., Buchwald, S.L. (2000) *Scope and limitation of the Pd/BINAP-catalyzed amination of aryl bromides*, J. Org. Chem., 63, 1144-1157.
- ⁸⁰ Guari, Y., Strijdonck, G.P.F., Boele, M.D.K., Reek, J.N.H., Kamer, P.C.J., Leeuwen, P.W.N.M. (2001) *Palladium-catalyzed amination of aryl bromides and aryl triflates using diphosphane ligands: a kinetic study*, Chem. Eur. J. 7, 475-482.
- ⁸¹ Yin, J., Buchwald, S.L. (2001) *Pd-catalyzed intermolecular amidation of aryl halides: the discovery that Xantphos can be trans-chelating in a palladium complex*, J. Am. Chem. Soc., 124, 6043-6048.
- ⁸² Guari, Y., Es, D.S., Reek, J.N.H., Kamer, P.C.J., Leeuwen, P.W.N.M. (1999) *An efficient, palladium-catalysed, amination of aryl bromides*, Tetrahedron Lett., 40, 3789-3790.
- ⁸³ KligenSmith, L.M., Strieter, E.R., Barder, T.E., Buchwald, S.L. (2006) *New insights into xantphos/Pd-catalyzed C-N bond forming reactions: a structural and kinetic study*, Organometallics, 25, 82-91.
- ⁸⁴ Nishiyama, M., Yamamoto, T., Koie, Y. (1998) *Synthesis of N-arylpiperazines from aryl halides and piperazine under a palladium tri-tert-butylphosphine catalyst*, Tetrahedron Lett., 39, 617-620.
- ⁸⁵ Surry, D.S., Buchwald, S.L. (2008) *Biaryl phosphane ligands in palladium-catalyzed amination*, Angew. Chem. Int. Ed., 47, 6338-6361.
- ⁸⁶ Muci, A., Buchwald, S.L. (2002) *Practical palladium catalysts for C-N and C-O bond formation* Topics in Current Chemistry, 219, 131-209.
- ⁸⁷ Zhang, L., Meng, T., Fan, R., Wu, J. (2007) *General and efficient route for the synthesis of 3,4-disubstituted coumarins via Pd-catalyzed site-selective cross-coupling reactions*, J. Org. Chem., 72, 7279-7286.
- ⁸⁸ Audisio, D., Messaoudi, S., Peyrat, J.F., Brion, J.D., Alami, M. (2007) *A convenient and expeditious synthesis of 3-(N-substituted)aminocoumarins via palladium-catalyzed Buchwald-Hartwig coupling reaction*, Tetrahedron Lett., 48, 6928-6932.
- ⁸⁹ Soussi, M.A., Audisio, D., Messaoudi, S., Provot, O., Brion, J.D., Alami, M. (2011) *Palladium-catalyzed coupling of 3-halo-substituted coumarins, chromenes and quinolones with various nitrogen-containing nucleophiles*, Eur. J. Org. Chem., 5077-5088.
- ⁹⁰ Chinchilla, R., Najera, C. (2007) *The Sonogashira Reaction: a booming methodology in synthetic organic chemistry*, Chem. Rev., 107(3), 874-922.
- ⁹¹ Sonogashira, K. (2002) *Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides*, J. Organomet. Chem., 653, 46-49.

- ⁹² Bertus, P., Fécourt, F., Bauder, C., Pale, P. (2004) *Evidence for the in situ formation of copper acetylides during Pd/Cu catalyzed synthesis of enynes: a new synthesis of allenynols*, New J. Chem, 28, 12-14.
- ⁹³ Barrios-Landeros, F, Hartwig, J. F. (2005) *Distinct mechanisms for the oxidative addition of chloro-, bromo-, and iodoarenes to a bisphosphine palladium(0) complex with hindered ligands*, J. Am. Chem. Soc., 127(19), 6944-6945.
- ⁹⁴ Thorand, S., Krause, N. (1998) *Improved procedures for the palladium-catalyzed coupling of terminal alkynes with aryl bromides (Sonogashira coupling)*, J. Org. Chem., 63, 8551-8553.
- ⁹⁵ Elangovan, A., Wang, Y.H., Ho, T.I. (2003) *Sonogashira coupling reaction with diminished homocoupling*, Org. Lett., 5(11), 1841-1844.
- ⁹⁶ Chow, H.F., Wan, C.W, Low, K.H., Yeung, Y.Y. (2001) *A highly selective synthesis of diarylethynes and their oligomers by a palladium-catalyzed Sonogashira coupling reaction under phase transfer conditions*, J. Org. Chem., 66, 1910-1913.
- ⁹⁷ McGaffin, G., De Meijere, A., (1994) *Pd(0)-Catalyzed Coupling Reactions of 2-Alkoxy-1-ethynylcyclopropanes with Aryl and Ethenyl Halides: Preparation of Cyclopropyl Substituted Ethynylarenes, Eneynes and Eneidyne*, 583-591.
- ⁹⁸ Mitra, A.K., de, A., Krachaudhuri, N., Mitra, J. (1998) *Palladium-catalysed synthesis of 3-substituted coumarins*, J. Chem. Res (S), 766-767.
- ⁹⁹ Schio L., Chatreaux, F., Klich, M. (2000) *Tosylates in palladium-catalysed coupling reactions. Application to the synthesis of arylcoumarin inhibitors of gyrase B*, Tetrahedron Lett., 41, 1543-1547.
- ¹⁰⁰ Wu, J., Liao, Y., Yang, Z.(2001) *Synthesis of 4-substituted coumarins via the palladium-catalyzed cross-couplings of 4-tosylcoumarins with terminal and organozinc reagents*, J. Org. Chem., 66, 3642-3645.
- ¹⁰¹ Schiedel, M.S., Briehn, C.A., Bäuerle, P. (2001) *Single-compound libraries of organic materials: parallel synthesis and screening of fluorescent dyes*, Angew. Chem. Int. ed., 40(24), 4677-4680.
- ¹⁰² Schiedel, M.S., Briehn, C.A., Bäuerle, P. (2002) *C-C Cross coupling reactions for the combinatorial synthesis of novel organic materials*, J. Organomet. Chem., 653, 200-208.
- ¹⁰³ Baik, C., Kim, D., Kang, M.S., Song, K., Kang, S.O., Ko, J. (2009) *Synthesis and photovoltaic properties of novel organic sensitizers containing indolo[1,2-f]phenanthridine for solar cell*, Tetrahedron, 65, 5302-5307.
- ¹⁰⁴ Yum, J.H., Hagberg, D.P., Moon, S.J., Karlsson, K.M., Marinado, T., Sun, L., Hagfeldt, A., Nazeeruddin, M.K., Grätzel, M. (2009), Angew. Chem. Int. ed., 48, 1576-1580.

- ¹⁰⁵ Goodson, F.E., Wallow, T.I., Novak, B.M. (1997) *Mechanistic studies on the aryl-aryl interchange reaction of ArPdL2I (L= triarylphosphine) complexes*, J. Am. Chem. Soc., 119, 12441-12453.4
- ¹⁰⁶ Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2005) In *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons Inc., 7ª Edição, p 223-224.
- ¹⁰⁷ Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. (2001) In *Organic Chemistry*, Oxford University Press, 1ª Edição, Oxford.
- ¹⁰⁸ Joseph, M.M., Jacob, D.E. (2004) *Reduction of polyfunctional aromatic nitro compounds using lithium aluminium hydride*, Indian J. Chem., 43B, 432-436.
- ¹⁰⁹ Rosa, A.M., Lobo, A.M., Branco, P.S., Prabhakar, S., Pereira, A.M.D.L. (1997) *Synthesis of phenanthridines by radical C_{aryl}-C_{aryl} coupling*, Tetrahedron, 53, 269-284.
- ¹¹⁰ Avó, J., Martins, S., Parola, A. J., Lima, J. C., Branco, P. S., Ramalho, J. P. P., Pereira A. (2013) *A family of styrylcoumarins: synthesis, spectroscopic, photophysical and photochemical properties*, ChemPlusChem, 78, 789 - 792.
- ¹¹¹ a) Eisenbrand, G., Otteneder, M., Tang (2003) *Synthesis of N-acetyl-S-(3-coumarinyl)-cysteine methyl ester and HPLC analysis of urinary coumarin metabolites*, Toxicology, 190, 249-253; b) Brites, M.J. (2005) Relatório de Actividades referente ao 2º Semestre, Departamento de Tecnologia das Indústrias Químicas, Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Lisboa.
- ¹¹² Rahman, A.U. (1990) in *Nuclear Magnetic Resonance*, Springer Verlag, p 146-177.
- ¹¹³ Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2005) In *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons Inc., 7ª Edição, p 220.
- ¹¹⁴ Kelkar, A.A., Patil, N.M., Chaudhari, R.V. (2002) *Copper-catalized amination of aryl halides: single-step synthesis of triaryl amines*, Tetrahedron Lett., 43, 7143-7146.
- ¹¹⁵ Choi, H., Baik, C., Kim, J.J., Song, K., Kang, S.O., Ko, J. (2007) *Synthesis of novel organic dyes containing coumarin moiety for solar cells*, Bull. Korean Chem. Soc., 28(11), 1973-1979.
- ¹¹⁶ Gigante, B., Esteves, M.A., Pires, N., Davies, M.L., Douglas, P., Fonseca, S.M., Burrows, H.D., Castro, R.A.E., Pina, J., Melo, J.S. (2007) *Synthesis, spectroscopy, photophysics and thermal behaviour of stilbene-based triaryl amines with dehydroabiatic acid methyl ester moieties*, New J. Chem., 33, 877-885.
- ¹¹⁷ Sá, S., Gawande, M.B., Velhinho, A., Veiga, J.P., Bundaleski, N., Trigueiro, J., Tolstogousov, A., Teodoro, O.M.N.D., Zboril, R., Varma, R.S., Branco, P.S. (2014) *Magnetically recyclable magnetite-palladium (Nanocat-Fe-Pd) nanocatalyst for the Buchwald-Hartwig reaction*, Green Chem., DOI: 10.1039/c4gc00558a.

- ¹¹⁸ Mao, M., Song, Q.H. (2012) *Non-conjugated dendrimers with a porphyrin core and coumarin chromophores as peripheral units: synthesis and photophysical properties*, *Dyes and pigments*, 92, 975-981.
- ¹¹⁹ Galoppini, E. (2004) *Linkers for anchoring sensitizers to semiconductor nanoparticles*, *Coordination Chemistry Reviews*, 248, 1283-1297.
- ¹²⁰ Hao, Y., Yang, X., Cong, J., Tian, H., Hagfeldt, A., Sun, L. (2009) *Efficient near infrared D- π -A sensitizers with lateral anchoring group for dye-sensitized solar cells*, *Chem. Commun.*, 4031-433.
- ¹²¹ Nascimento, Susana I. M, *Síntese e fotoquímica de fulerenos. Díades e tríades de C60 e de C70, e derivados de C76*, dissertação de doutoramento, IST, Outubro de 2008.
- ¹²² Dess, D.B., Martin, J.C. (1983) *Readily accessible 12-I-5¹ oxidant for the conversion of primary and secondary* *J. Org. Chem.* 48, 4155-4156.
- ¹²³ Dess, D.B., Martin, J.C. (1991) *A useful 12-I-5 triacetoxypersulfonane (the Dess-Martin persulfonane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species*, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 7277-7287.
- ¹²⁴ Dubey, A., Kandula, S.R., Kumar, P. (2008) *Dimethyl sulfoxide pivaloyl chloride: a new reagent for oxidation of alcohols to carbonyls*, *Synth. Commun.*, 38, 746-753.
- ¹²⁵ Cho, N., Choi, H., Kim, D., Song, K., Kang, M.S., Kang, S.O., Ko, J. (2009) *Novel organic sensitizers containing a bulky spirobifluorene unit for solar cell*, *Tetrahedron*, 65, 6236-6243.
- ¹²⁶ Cargaleiro, S.R.V. (2013) *Funcionalização da 7-amino-4-metilcumarina*, Projecto em Química Orgânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- ¹²⁷ Reynolds, G.A., Drexhage, K.H. (1975) *New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers*, *Opt. Commun.*, 13, 222-235.
- ¹²⁸ Kim, D., Kim, C., Choi, H., Song, K., Kang, M.S., Ko, J. (2011) *A new class of organic sensitizers with fused planar triphenylamine for nanocrystalline dye sensitized solar cells*, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 219, 122-131.
- ¹²⁹ Hansch, C., Leo, A., Taft, R.W. (1991) *A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters*, *Chem. Rev.*, 91, 165-195.
- ¹³⁰ Perrin, D.D., Armarego, W.L.F., Perrin, D.P. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2^a Ed., Pergamon Press, Oxford, 1980.
- ¹³¹ Stahl, E., *Thin-layer Chromatography. A Laboratory Handbook* (1969) Springer, Berlin.

Referências

- ¹³² Wolfe, J.P., Wagaw, S., Marcoux, J.F., Buchwald, S.L. (1998) *Rational development of practical catalysts for aromatic carbon-nitrogen bond formation* Acc. Chem. Res. 31, 805-818.
- ¹³³ Rosa, A.M., Lobo, A.M., Branco, P.S., Prabhakar, S., Pereira, A.M.D.L. (1997) *Synthesis of phenanthridines by radical $C_{aryl}-C_{aryl}$ coupling*, Tetrahedron, 53, 269-284.
- ¹³⁴ Kleiderer, E.C., Adams, R. (1933) *Stereochemisry of diphenils. XXXL. Preparation and properties of 2,2',6,6'-tetrafluoro-3,3'-dicarboxy-5,5'-dichlorodiphenyl*, J. Am. Chem. Soc., 55, 4219-4225.
- ¹³⁵ Mao, M., Song, Q.H. (2012) *Non-conjugated dendrimers with a porfyrin core and coumarin chromophores as peripheral units: synthesis and photophysical properties*, Dyes and pigments, 92, 975-981.

ANEXO

ARTIGOS PUBLICADOS

Antineoplastic 31-Norcycloartanones from *Solanum cernuum* Vell.

Rogério Grando^a, Marcia A. Antônio^b, Carlos E. P. Araújo^b, Catarina Soares^c, Maria A. Medeiros^d, João E. de Carvalho^c, Ana M. Lourenço^{c,*}, and Luciane C. Lopes^a

^a Faculdade de Farmácia da Universidade Metodista de Piracicaba, Rodovia do Açúcar Km 156, 13400-911 Taquaral, Piracicaba, SP, Brazil

^b Universidade de São Francisco, Av São Francisco Assis 218, Caixa Postal 163, 12916900 Bragança Paulista, SP, Brazil

^c REQUIMTE/CQFB, Departamento de Química, FCT, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal. Fax: +35 12 12 94 85 50. E-mail: ana.lourenco@dq.fct.unl.pt

^d Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Departamento de Tecnologia das Indústrias Químicas, Azinhaga dos Lameiros, 1699-038 Lisboa, Portugal

^e CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas da Universidade de Campinas, UNICAMP, SP, Brazil

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **63c**, 507–514 (2008); received January 18/March 3, 2008

Triterpenoids with 31-norcycloartanone structure were isolated for the first time from the *Solanum* genus. Cycloeucalenone and 24-oxo-31-norcycloartanone were the main constituents of the dichloromethane extract of *Solanum cernuum* Vell. leaves [7% (w/w) and 1.47% (w/w)]. Both triterpenoids were tested against human tumour cell lines, and 24-oxo-31-norcycloartanone was significantly active and selective against the lung tumour cell line NCI-H460 with total growth inhibition at 1.10 $\mu\text{g/mL}$, growth inhibition 50 at 0.19 $\mu\text{g/mL}$ and lethal concentration 50 at 8.43 $\mu\text{g/mL}$, while cycloeucalenone showed poor activity. A homologous series of alkanes (C_{25} – C_{34}), β -sitosterol, and the xanthophyll lutein were also identified. The antiulcer activity was assayed for the dichloromethane extract. In the gastric ulcer model induced by 95% ethanol, administration of 500, 1000 and 2000 mg/kg/*po* dichloromethane extract gave ulcer lesion indices of, respectively, 38.2, 61.0 and 81.9%, while carbenoxolone inhibited 88.9% at 200 mg/kg. In the gastric ulcer model induced by indomethacin the dichloromethane extract showed a small percentage of lesion inhibition. The ethanol extract was also analyzed and was mainly composed of glycoalkaloids, peptides and disaccharides.

Key words: *Solanum cernuum* Vell., 31-Norcycloartanones, Antineoplastic Activity

Introduction

Medicinal plants play an important role in the discovery of new drugs. Natural products are directly or indirectly responsible for almost 40% of the drugs used in modern therapeutics, and considering antibiotics and antitumour agents this number goes up to 70% (Newmann *et al.*, 2003). The world market of phytotherapeutic drugs moves near 14 billion US\$ per year, and just in Germany this number reaches 3 billions US\$ followed by France and Italy. These large values are justified attending the WHO data indicating that 80% of the world population consumes medicines based on plant materials. It must be also considered that the development of new synthetic drugs demands for high costs and that the ethnopharmacology is a precious guide for the selection of plant extracts and compounds.

The *Solanum* genus is used in traditional medicine by different cultures for distinct purposes. Some species of the genus are valuable due to their nutritional and mainly medicinal properties that can justify their use in the composition of phytotherapeutic medicines. On this basis we consider that the use of the Brazilian plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae) in folk medicine is an important unexplored subject. This species grows in the states of Rio de Janeiro and Minas Gerais; it is commonly known as panacéia and braço-de-preguiça, and described as sempre florida (always flowering) (Lorenzi and Matos, 2000). Infusions of the aerial parts are used in the treatment of gastric ulcers, liver injuries, skin affection, as antitumour, depurative, diuretic, and as antihemorrhagic and antileukorrhea agents (Esteves-Souza *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2002; Rodrigues and Carvalho, 2001). The roots are used as infusion or as decoction.

tion in haemorrhages treatment (Rodrigues and Carvalho, 2001). The leaves are also used as infusion with tranquilizing action for cardiac problems (Lorenzi and Matos, 2000). Despite the common use, in the Brazilian Farmacopeia there is no reference to *S. cernuum* Vell. Considering the traditional use of the genus the study of *S. cernuum* Vell. is an unexplored field of chemical and pharmacological research. Having the above statements in mind our work includes chemical and biological activity studies, and their relation with genus data. The chemical constituents of the dichloromethane extract were determined, and its ability to prevent gastric ulceration as evaluated as antitumour activity of the pure compounds from the dichloromethane extract. The ethanol extract was screened for its chemical composition.

Chemical constituents of the *Solanum* genus have been described as steroidal and alkaloid glycosides (Ono *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 1998), sterols (Zygadlo, 1994), flavonoids (Silva *et al.*, 2003) and also nitrogen-containing non-steroidal metabolites such as *N*-acyltriamines and pyrrole alkaloids (Evans and Somanabandhu, 1980; El-Sayed *et al.*, 1998). Several pharmacological and toxicological studies of these compounds proved their broad spectrum of activities such as the action against malignant and benign human skin tumours, cytotoxicity against human tumour cell lines, and as antidiabetogenic, antihepatotoxic, antineoplastic, antiviral and antioxidant agents (Cham *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1999; Arthan *et al.*, 2002). For *S. cernuum* Vell. species there are no specific studies on its nature as far as we know. The single study on *S. cernuum* Vell. found in the literature concerns the evaluation of the antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of the aerial parts of the plant where a significant antiulcerative activity is referred (Araujo *et al.*, 2002).

Materials and Methods

Plant material

S. cernuum Vell. leaves were collected at Bragança Paulista (SP, Brazil) in September 2004. A voucher specimen (VELL N° 653) is deposited at the herbarium Frei Velloso of the São Francisco University (Bragança Paulista, SP, Brazil).

Extraction and isolation

The oven-dried (45 °C) and powdered leaves (600 g) were extracted three times with dichloro-

methane by maceration. The residue was washed three times with 95% ethanol. Both solvents were evaporated under reduced pressure to obtain the dichloromethane (40 g) and ethanol (55 g) extracts. The dichloromethane extract was chromatographed on a silica gel 60 (Merck 7734) (10% deactivated with water) column, eluted with *n*-hexane/ethyl acetate mixtures of increasing polarity (9:1 and 7:3). The fraction compositions were followed by TLC (silica gel F₂₅₄ 0.20 mm, Merck 5554). The fraction eluted with *n*-hexane yielded a series of alkanes (C₂₅–C₃₄) (1.22 g, 3.05%). The triterpenoid fraction was eluted with *n*-hexane/ethyl acetate (9:1) and purified by successive CC and preparative TLC (silica gel F₂₅₄ 0.5 mm, Merck 5744), eluted with *n*-hexane/ethyl acetate mixtures. The steroid fraction was composed of cycloeucalenone (2.80 g, 7.0%), 24-oxo-31-norcycloartanone (589 mg, 1.47%) and β -sitosterol (146 mg, 0.36%). The fraction eluted with *n*-hexane/ethyl acetate (7:3) was further subject to CC purifications with dichloromethane/methanol or chloroform/diethyl ether mixtures to yield lutein (380 mg, 0.95%). The ethanol extract was divided into two parts. A fraction was subject to CC on a LiChroprep RP-18 (Merck 13900) column with successive water and methanol elution. The water elution was controlled by TLC, and compounds were detected with α -naphthol reagent specific for sugars detection. By the alditol acetates method the water fraction proved to be mainly composed of disaccharides (Blakeney *et al.*, 1983). The methanol fractions were checked for alkaloids using the Dragendorff reagent. By FT-IR and ¹H NMR analyses the methanol fraction proved to be composed of glycoalkaloids. The second fraction of the ethanol extract was chromatographed by HPLC using an RP-18 Thermo ODS Hypersil (250 × 4.6 mm) column and elution with a water/methanol gradient. Under these conditions the ethanol extract proved to be composed of a major component of peptide nature which was detected by TLC with ninhydrine reagent, together with FT-IR and NMR analyses.

Physical and spectroscopic measurements

A Perkin-Elmer 241MC polarimeter was used to measure the optical specific rotation. FT-IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum 1000 spectrometer, as KBr pellets, and UV-Vis spectra were recorded in methanol solution

on a Milton Roy-Spectronic 1201 instrument. ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra were recorded on a Bruker ARX400 NMR spectrometer. The NMR spectra were recorded in CDCl_3 or CD_3OD and referenced by the residual solvent signals (chloroform: δ 7.26 ppm and 77.0 ppm; methanol: δ 3.30 ppm and 49.0 ppm); δ values are expressed in ppm. The GC-EI-mass spectra were taken on a Micromass GC-TOF (GCT) instrument with a DB1 column (0.32 mm i. d.; 0.25 μm film thickness; 30 m length). The GC operating conditions employed were as follows: carrier gas, He; split, 1:10; injection port temperature, 250 $^\circ\text{C}$; temperature program: 120 $^\circ\text{C}$ held for 3 min, increased at 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 300 $^\circ\text{C}$, held for 10 min. The mass spectra were performed by the analytical services laboratory of REQUIMTE. HPLC was performed on a system equipped with a Merck Hitachi L-7100 pump, Merck Hitachi L-7450A diode array detector and a LiChroCart[®] RP-18 column (250 \times 10 mm).

24-Oxo-31-norcycloartanone (2)

White amorphous solid (589 mg). – $[\alpha]_D^{20} + 53.3^\circ$ (c 0.46, CHCl_3). – ^{13}C NMR: see Table I. – GC-EIMS: m/z (rel. int.) = 426 (38) $[\text{M}]^+$, 411 (23), 340 (83), 325 (7), 299 (100), 287 (2), 257 (11), 243 (8), 221 (5), 136 (53).

Antiproliferative assay

Cell lines from different histological origins were used in the present study. Human tumour cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-H460 (lung, non-small cells), OVCAR-3 (ovary), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-O (renal) and NCI-ADR/RES (ovary expressing multiple drug resistance phenotype) were kindly provided by the National Cancer Institute (NCI, Frederick, Maryland, USA). Stock cultures were grown in a medium of 5 mL RPMI-1640 (Gibco[®], NY, USA) supplemented with 5% of fetal bovine serum (Gibco[®]). Gentamicine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the experimental cultures. DOX was the reference drug used in these antiproliferative assays.

Cells in 96-well plates (100 μL cells/well; inoculation density ranging from 4 to $7 \cdot 10^4$ cells/mL) were exposed to various concentrations of samples in RPMI/DMSO (0.25, 2.5, 25, and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 in air for 48 h. The final concentration of DMSO (Sigma Chemical Co, St Louis, MO,

USA) did not affect the cell viability. Afterwards the plates were incubated with a 50% solution of TCA (Merck[®], SP, Brazil) for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$ for cell fixation. After washing and drying, the cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of the cellular protein content using SRB dye (Sigma). The absorbance data was used in order to calculate the total growth inhibition (TGI), the growth inhibition 50 (GI 50) and the lethal concentration 50 (LC 50) by a sigmoidal parametric regression using Origin 7.1 software.

Antiulcer activity

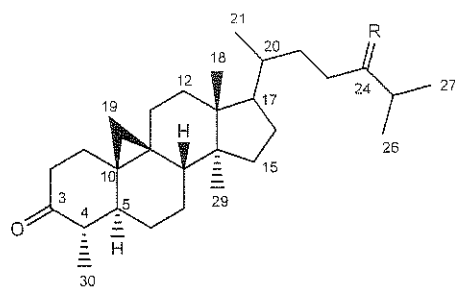
The antiulcer activity was evaluated using two different assay models for the induction of acute gastric mucosal lesions: 95% ethanol (Robert *et al.*, 1979) and indomethacin (Morimoto *et al.*, 1991). Male Wistar rats of 190–210 g weight ($n = 6$) were used in both methods. The animals were kept, with water *ad libitum*, in proper cages, to prevent coprophagy, and fasted for 24 h. The treatments were oral administrations – *per os* (*po*). In positive control groups, animals were treated with carbenoxolone (200 mg/kg/*po*). After each experiment, the animals were sacrificed by cervical dislocation. The stomachs were removed, opened along the greater curvature and fixed between two glass plates. The lesions were measured by the Gamberini method (Gamberini *et al.*, 1991).

In the 95% ethanol-induced lesions model the animals received 95% ethanol (1 mL/kg/*po*) 1 h after the administration of the dichloromethane extract of *S. cernuum* Vell. (500, 1000, 2000 mg/kg). The animals were sacrificed 1 h after the administration of the ulcer agent for evaluation of the antiulcer activity and DE 50 determination.

In the indomethacin-induced lesions model the animals received the ulcer agent (40 mg/kg) 1 h after the administration of the dichloromethane extract of *S. cernuum* Vell. (1000 mg/kg). The animals were sacrificed 6 h after the administration of the ulcer agent for evaluation of the antiulcer activity and DE 50 determination.

Results and Discussion

The most abundant constituents of the dichloromethane extract are triterpenes with a 31-norcycloartanone skeleton that have never been described in the *Solanum* genus. These compounds possess a C-9,19 cyclopropane unit and a methyl



R = CH₂ Cycloeucalenone (**1**)
R = O 24-Oxo-31-norcycloartanone (**2**)

Fig. 1. Chemical structures of compounds **1** and **2**.

group at C-4. The major compound isolated, cycloeucalenone (**1**), occurs in 7% (w/w), which represents a significant amount of the dichloromethane extract. It has a 3-oxo- $\Delta^{24(28)}$ structure and is mainly known from the fruit peel of *Musa sapientum* L. (Musaceae) (Akihisa *et al.*, 1986). It has also been obtained by oxidation of the alcohol analogue, cycloeucalenol (Cocker *et al.*, 1965). Later these authors reported the identification of its C-4 epimer (Akihisa *et al.*, 1997). Cycloeucalenone has also been described as produced from fungus source (Ondeyka *et al.*, 2005) and from *Tinospora crispa* (Menispermaceae) (Kongkathip *et al.*, 2002). In this last work **1** was tested as cardiac contractile agent. It showed slight change from the control on the right and left atrial force which means that it induces mild cardiostimulant effects. So it can be considered that this metabolite could contribute to the known tranquilizing action of *S. cernuum* Vell. during cardiac problems. **1** was identified by spectroscopic studies and by comparison with published data (Dahmén and Leander, 1978). The value of specific optical rotation was important to assure the stereochemistry of cycloeucalenone (**1**), namely the orientation of the methyl group at C-4. The value that we obtained, $[\alpha]_D^{20} +54.9^\circ$ (*c* 0.67, CHCl₃), is in agreement with that described in the literature, $[\alpha]_D^{20} +54.4^\circ$ (*c* 0.89, CHCl₃) (Cocker *et al.*, 1965), for **1** [24 α -methyl-31-norcycloart-24(28)-en-3-one] (Fig. 1).

Compound **2** is a minor 31-norcycloartanone triterpenoid isolated from the dichloromethane extract (1.47% w/w). It proved to be 24-oxo-31-norcycloartanone by spectroscopic data in comparison with the only reference found in the literature (Akihisa *et al.*, 1998) that describes its

isolation from *Musa sapientum* L. Here we report for the first time the ¹³C NMR data of **2**, that was assigned by 2D NMR experiments, and also the specific optical rotation value, $[\alpha]_D^{20} +53.3^\circ$ (*c* 0.46, CHCl₃). The ¹³C NMR spectrum of **2** showed twenty nine resonances, of which twenty one were attributed to the triterpenoid nucleus and seven to a lateral chain. The DEPT NMR experiment permitted the differentiation of the ¹³C NMR resonances into six methyl, eleven methylene, six methine, and six quaternary carbon atoms. Characteristic resonances of the triterpenoid nucleus were identical to those described for cycloeucalenone (**1**). The resonances of the remaining three secondary methyl, two methylene, two methine, and one quaternary carbon atoms were assigned by 2D NMR experiments (Table I).

Table I. ¹³C NMR (100 MHz) spectral data of 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) (CDCl₃).

C	δ_C		HMBC
1	32.8	<i>t</i>	H-19
2	40.9	<i>t</i>	—
3	203.3	<i>s</i>	H-30
4	50.0	<i>d</i>	H-30
5	46.0	<i>d</i>	H-30
6	25.2	<i>t</i>	—
7	28.0	<i>t</i>	—
8	47.0	<i>d</i>	—
9	24.9	<i>s</i>	—
10	24.9	<i>s</i>	—
11	25.9	<i>t</i>	—
12	35.4	<i>t</i>	—
13	45.4	<i>s</i>	H-18, H-21
14	48.8	<i>s</i>	H-29
15	32.8	<i>t</i>	—
16	26.9	<i>t</i>	—
17	52.2	<i>d</i>	H-18, H-21
18	17.9	<i>q</i>	—
19	27.1	<i>t</i>	—
20	35.7	<i>d</i>	—
21	18.4	<i>q</i>	H-17
22	30.1	<i>t</i>	H-21
23	37.5	<i>t</i>	—
24	215.4	<i>s</i>	H-25, H-26, H-27
25	40.8	<i>d</i>	H-26, H-27
26	18.3 ^a	<i>q</i>	H-25, H-27
27	18.1 ^a	<i>q</i>	H-25, H-26
29	19.1	<i>q</i>	—
30	10.7	<i>q</i>	H-4

δ values of compound **2** are referenced to the signal of residual CHCl₃ (δ 77.0 ppm).

^a Interchangeable signals.

β -Sitosterol was also identified (Goad and Akihisa, 1997) and represents 0.36% (w/w) of the dichloromethane extract. Besides the above de-

scribed compounds a series of alkanes (C_{25} – C_{34}) and the potent antioxidant xanthophyll lutein (Milborrow *et al.*, 1982) were identified by chemical and spectroscopic data. They are the less and the most polar constituents of the dichloromethane extract and are present in 3.05% and 0.95% (w/w), respectively.

The search for the metabolites responsible for the antitumour action is one of the main interests of our work. As it is known different cell lines display different sensitivities towards a cytotoxic compound. The use of more than one cell line is therefore considered necessary in the detection of cytotoxic compounds. Bearing this in mind, cell lines from different histological origins were used in the present study: human tumour cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-H460 (lung, non-small cells), OVCAR-3 (ovary), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-O (renal) and NCI-ADR/RES (ovary expressing multiple drug resistance phenotype). Cycloeucalenone (**1**) and 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) were tested against the above mentioned cell lines. **1** showed no interesting results but **2** exhibited significant activities in comparison with the values obtained for the reference compound DOX. **2** produced significant growth inhibition and cellular death of lung cell lines with TGI of 1.10 $\mu\text{g/mL}$, GI 50 of 0.19 $\mu\text{g/mL}$ and LC 50 of 8.43 $\mu\text{g/mL}$. In Table II and Fig. 2 the total results for 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) against all tumour cell lines tested are presented. Here we conclude that this triterpenoid is

Table II. Results of the action of 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) against the following cell lines ($\mu\text{g/mL}$): human tumour cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-H460 (lung, non-small cells), OVCAR-3 (ovary), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-O (renal) and NCI-ADR/RES (ovary expressing multiple drug resistance phenotype).

Cell line	TGI	GI 50	LC 50
UACC-62	> 250	28.60	> 250
MCF-7	158.30	28.70	> 250
NCI-H460	1.10	0.19	8.43
OVCAR-3	> 250	> 250	> 250
PC-3	> 250	89.90	> 250
HT-29	> 250	> 250	> 250
786-O	> 250	47.73	> 250
NCI-ADR/RES	79.20	24.90	> 250

TGI, total growth inhibition; GI, growth inhibition 50; LC, lethal concentration 50; >250, the concentration could not be calculated because it has exceeded the highest concentration tested.

effective and selective against the lung non-small cell line NCI-H460.

As mentioned above *S. cernuum* Vell. is traditionally used in gastric ulcer treatments and the ethanol extract proved to exhibit a significant anti-ulcerative activity (Araujo *et al.*, 2002). As such we investigated the dichloromethane extract for its antiulcer activity. The gastric ulcer induced by the 95% ethanol model expressed as the ulcer lesion indices (ULI) obtained from the treatment of Wistar rats with 500, 1000 and 2000 mg/kg/*po* of the dichloromethane extract were respectively 38.2,

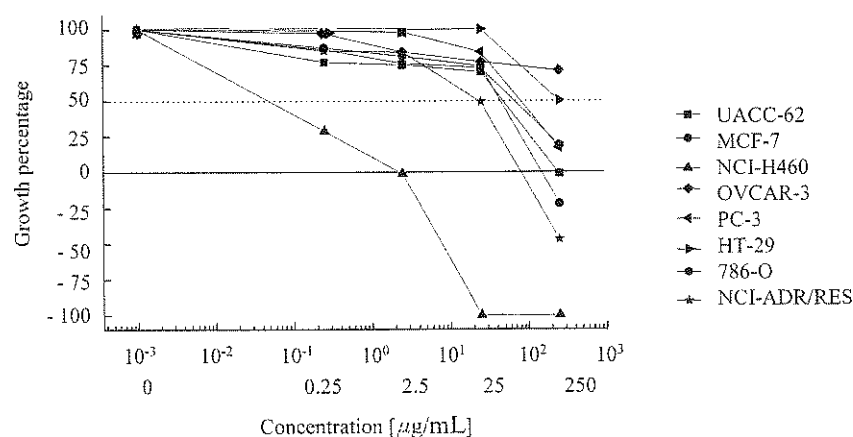


Fig. 2. Growth percentage of cell lines [human tumour cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-H460 (lung, non-small cells), OVCAR-3 (ovary), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-O (renal) and NCI-ADR/RES (ovary expressing multiple drug resistance phenotype)] in the presence of different concentrations of 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**).

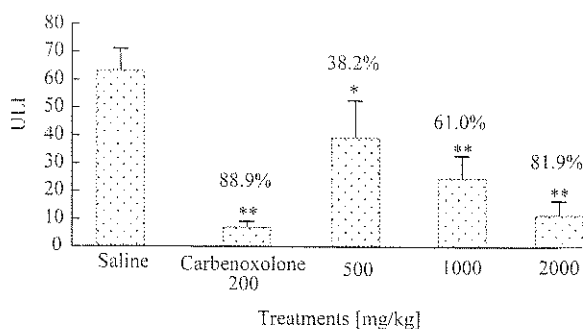


Fig. 3. Mean \pm SEM of ulcerative lesions index (ULI) obtained with different doses of the dichloromethane extract of *Solanum cernuum*, saline (0.9% NaCl) and carbenoxolone (200 mg/kg) on the ethanol model. ANOVA and Dunnett's test were used for comparison (* p < 0.05; ** p < 0.001; n = 6). ANOVA $F_{(4,22)} = 19.95$, p < 0.001. Duncan assay, * p < 0.01, ** p < 0.001.

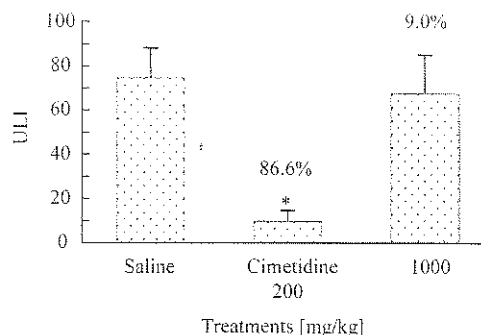


Fig. 4. Mean \pm SEM of ulcerative lesions index (ULI) obtained with a dichloromethane extract of *Solanum cernuum*, saline (0.9% NaCl) and cimetidine (200 mg/kg) on the indomethacin model. ANOVA and Dunnett's test were used for comparison (* p < 0.05; ** p < 0.001; n = 6). ANOVA $F_{(2,13)} = 34.69$, p < 0.001. Duncan assay, * p < 0.01.

61.0 and 81.9%, while carbenoxolone inhibited by 88.9% (Fig. 3). The acute administration of absolute ethanol to rats produces gastric mucosal lesions and erosions similar to those occurring in gastric ulcer (Giordano *et al.*, 1990). The tissue damage of the gastrointestinal mucosa induced by acute ethanol toxicity may be associated with the generation of toxic reactive species which produce an unbalanced oxidant/antioxidant cellular process. When the antioxidant defence system is insufficient free radicals are accumulated causing injuries to the cell membrane, oxidative damage and cell death if the insult continues (Repetto and Llesuy, 2002). Another hypothesis proposed to explain the ethanol-induced oxidative damage to the gastric mucosa is the constrictive effect on veins and arteries of the gastric mucosa, producing congestion, inflammation and tissue injuries. Herbs are recognized as sources of natural antioxidants that can protect from oxidative stress and thus play an important role in the chemoprevention of diseases resulting from lipid peroxidation (Nakatani, 2000). The mild activity of the dichloromethane extract of *S. cernuum* Vell. could be regarded acting as protective factor or increasing antioxidant activity, and as such as a mechanism of local cytoprotection. The gastric ulcer induced by indomethacin (40 mg/kg) had no statistic results (p > 0.05) and only small percentage of inhibition lesions, *i.e.* the mechanism of action involved is not related with prostaglandin effects (Fig. 4). We can conclude from our antiulcer assays that the metabolites present in the dichloromethane extract do

not contribute to the traditional use of *S. cernuum* Vell. as an antiulcerogenic. For this action more polar compounds should be responsible.

The ethanol extract was subject to chemical screening. By specific reagent analysis, NMR experiments, FT-IR and mass spectra data, the presence of glycoalkaloids was confirmed as it was expected. These compounds are neither solasodine nor solanidine which are the most common alkaloids encountered in *Solanum* species and known for their anticancer activity. Major compounds of the ethanol extract have small peptide structures and are compounds described as cytotoxic against tumour cell lines (Li *et al.*, 2003). The saccharide fraction was mainly composed of disaccharides.

Important metabolites have been identified in the dichloromethane and ethanol extracts of *S. cernuum* Vell. that can contribute to explain in part the traditional use of the species and consequently justify further studies that are now in progress.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Fernando de Oliveira for plant culture. Research has been performed under the auspices of CYTED (Subprogram X, Project X.10 PIGASTRIN).

Akihisa T., Shimizu N., Tamura T., and Matsumoto T. (1986), (24*S*)-14*a*,24-Dimethyl-9*β*,19-cyclo-5*a*-cholest-25-en-3*β*-ol: a new sterol and other sterols in *Musa sapientum*. *Lipids* **21**, 494–497.

Akihisa T., Kimura Y., Wilhelmus C. M. C. K., Takase S., Yasukawa K., Jin-Nai A., and Tamura T. (1997), 4-Epicycloeucalenone and 4-epicyclomusalenone: Two

- 3-oxo-28-norcycloartanes from the fruit peel of *Musa sapientum* L. Chem. Pharmaceut. Bull. **45**, 744–746.
- Akihisa T., Kimura Y., and Tamura T. (1998), Cycloartane triterpenes from the fruit peel of *Musa sapientum*. Phytochemistry **47**, 1107–1110.
- Araujo C. E. P., Rodrigues R. F. O., Oliveira F., and Schreiner L. (2002), Análise preliminar da atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de *Solanum cernuum* Vell. Acta Farm. Bonaerense **21**, 283–286.
- Arthan D., Svasti J., Kittakoop P., Pittayakhachonwut D., Tanticharoen M., and Thebtaranonth Y. (2002), Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. Phytochemistry **59**, 459–463.
- Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J., Bruce A., and Stone B. A. (1983), A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. Carbohydrate Res. **113**, 291–299.
- Cham B. E., Daunter B., and Evans R. A. (1991), Topical treatment of malignant and premalignant skin lesions by very low concentrations of a standard mixture (BEC) of solasodine glycosides. Cancer Lett. **59**, 183–192.
- Cocker W., McMurtry T. B. H., and Ntamila M. S. (1965), Extractives from woods. Part VII. Extractives from *Cephalosphaera usambarensis* Warb. J. Chem. Soc., 1692–1699.
- Coelho R. M., Souza M. C., and Sarragiotto M. H. (1998), Steroidal alkaloid glycosides from *Solanum orbignianum*. Phytochemistry **49**, 893–897.
- Dahmén J. and Leander K. (1978), A new triterpene glucoside from *Cymbidium giganteum*. Phytochemistry **17**, 1975–1978.
- El-Sayed K. A., Hamann M. T., El-Rahman H. A. A., and Zaghloul A. M. (1998), New pyrrole alkaloids from *Solanum sodomaeum*. J. Nat. Prod. **61**, 848–850.
- Esteves-Souza A. E., Silva T. M. S., Alves C. C. F., Carvalho M. G., Braz-Filho R., and Echevarria A. (2002), Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. J. Braz. Chem. Soc. **13**, 838–842.
- Evans W. C. and Somanabandhu A. (1980), Nitrogen-containing non-steroidal secondary metabolites of *Solanum*, *Cyphomandra*, *Lycianthes* and *Margarantus*. Phytochemistry **19**, 2351–2356.
- Gamberini M. T., Skorupa L. A., Souccar C., and Lapa A. J. (1991), Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*. Mart. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **86**, Suppl. II, 137–139.
- Giordano O., Guerreiro E., Pestchanker M., Guzmán J., Pastor D., and Guardia T. (1990), The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. J. Nat. Prod. **53**, 803–809.
- Goad L. J. and Akihisa T. (1997), Analysis of Sterols. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London.
- Hu K., Kobayashi H., Dong A., Jing Y., Iwasaki S., and Yao X. (1999), Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. Planta Med. **65**, 35–38.
- Ikeda T., Tsumagari H., Honbu T., and Nohara T. (2003), Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. Biol. Pharmaceut. Bull. **26**, 1198–1201.
- Kongkathip N., Dhumma-upakorn P., Kongkathip B., Chawanoraset K., Angchomkao P., and Hatthakitpanichakul S. (2002), Study on cardiac contractility of cycloeucanol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. J. Ethnopharmacol. **83**, 95–99.
- Li W. L., Yi Y. H., Wu H. M., Xu Q. Z., Tang H. F., Zhou D. Z., Lin H. W., and Wang Z. H. (2003), Isolation and structure of the cytotoxic cycloheptapeptide phakellistatin 13. J. Nat. Prod. **66**, 146–148.
- Lin C. N., Chung M. I., and Gan K. H. (1988), Novel antihepatotoxic principles of *Solanum incanum*. Planta Med. **54**, 222.
- Lorenzi H. and Matos F. J. A. (2000), Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da flora Ltda, São Paulo. p. 459.
- Milborrow B. V., Swifts I. E., and Netting A. G. (1982), The stereochemistry of hydroxylation of the carotenoid lutein in *Calendula officinalis*. Phytochemistry **21**, 2853–2857.
- Morimoto A., Watanabe T., Morimoto K., Nakamori T., and Murakami N. (1991), Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats. J. Physiol. **443**, 421–429.
- Nakatani N. (2000), Phenolic antioxidants from herbs and spices. Biofactors **13**, Suppl. 1–4, 141–146.
- Newmann D. J., Cragg G. B., and Snader K. M. (2003), Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. J. Nat. Prod. **66**, 1022–1037.
- Ondeyka J. G., Jayasuriya H., Herath K. B., Guan Z., Schulman M., Collado J., Dombrowski A. W., Kown S. S., McCallum C., Sharma N., MacNaul K., Hayes N., Menke J., and Singh S. B. (2005), Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors. J. Antibiot. **58**, 559–565.
- Ono M., Nishimura K., Suzuki K., Fukushima T., Igishi K., Yoshimitsu H., Ikeda T., and Nohara T. (2006), Steroidal glycosides from the underground parts of *Solanum sodomaeum*. Chem. Pharmaceut. Bull. **54**, 230–233.
- Repetto M. G. and Llesuy S. F. (2002), Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. Braz. J. Med. Biol. Res. **35**, 523–534.
- Robert A., Nezamis J. E., Lancaster C., and Hancher A. J. (1979), Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. Gastroenterology **77**, 433–443.
- Rodrigues V. E. G. and Carvalho D. A. (2001), Ethnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande – Minas Gerais. Revista Ciência e Agrotecnologia **25**, 102–123.
- Silva T. M. S., Carvalho M. G., Braz-Filho R., and Agra M. F. (2003), Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (SOLANACEAE). Quim. Nova **26**, 517–522.
- Yoshikawa M., Nakamura S., Ozaki K., Kumahara A., Morikawa T., and Matsuda H. (2007), Structures of steroidal oligoglycosides, robeneosides A and B, and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. J. Nat. Prod. **70**, 210–214.

- Zhou X., He X., Wang G., Gao H., Zhou G., Ye W., and Yao X. (2006), Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. J. Nat. Prod. **69**, 1158–1163.
- Zygadlo J. A. (1994), A comparative study of sterols in oil seeds of *Solanum* species. Phytochemistry **35**, 163–167.

Pharmacological characterization of *Solanum cernuum* Vell.: 31-norcycloartanones with analgesic and anti-inflammatory properties

Luciane C. Lopes · João Ernesto de Carvalho · Marise Kakimore ·
Débora B. Vendramini-Costa · Maria A. Medeiros · Humberto M. Spindola ·
Javier Ávila-Román · Ana M. Lourenço · Virginia Motilva

Received: 26 March 2013 / Accepted: 20 July 2013 / Published online: 9 August 2013
© Springer Basel 2013

Abstract Cycloeucalenone (**1**) and 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) obtained from *Solanum cernuum* Vell. were assayed to explore their pharmacologic roles. Previous studies showed that (**2**) has selective activity against lung tumor cell line (NCIH460) which expresses high levels of COX-2, suggesting its role in inflammatory process, and also a link between chronic inflammation and cancer-associated process. Dichloromethane crude extract (DCE) significantly reduced writhing and stretching induced by 0.8 % acetic acid at a dose of 100, 300, and 600 mg/kg, po; oral administration of different doses of (**1**) and (**2**) also displayed significant analgesic and anti-inflammatory effects in the writhing acetic acid test ($p < 0.0001$). Selected oral doses of both compounds (100 and 50 mg/kg)

were assayed in the carrageenan-induced paw edema model. Compound (**2**) showed significant activity during the early phase (1.5–6 h) and also in the late phase (48 h) ($p < 0.01$). The anti-nociceptive activity observed for the compounds (**1**) and (**2**) and DCE was found to be related to the inhibition of different mediators involved in inflammation and nociceptive process. Both compounds decrease COX-2 protein expression, although only compound (**2**) reached a significant response ($p < 0.05$ vs control). However, in vitro Sirtuin 1 activity and TNF- α production in THP-1 macrophages were not affected.

Keywords *Solanum cernuum* Vell. · 31-Norcycloartanones · Analgesic · Anti-inflammatory · COX-2

L. C. Lopes · M. Kakimore
Programa de Pós-Graduação strictu sensu em Ciências
Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, UNISO, Rodovia
Raposo Tavares, KM 92.5, Sorocaba, SP Cep 18023-000, Brazil

J. E. de Carvalho · D. B. Vendramini-Costa · H. M. Spindola
CPQBA-Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,
Biológicas e Agronômicas da Universidade de Campinas,
UNICAMP, CP 6171, Campinas, SP 13083-970, Brazil

M. A. Medeiros
Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Unidade de
Energia Solar, Eólica e dos Oceanos UESEO, Estrada do Paço do
Lumiãr, 22, 1649-038 Lisbon, Portugal

J. Ávila-Román · V. Motilva (✉)
Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia,
Universidad de Sevilla, 41010 Sevilla, Spain
e-mail: motilva@us.es

A. M. Lourenço
REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa,
2829-516 Caparica, Portugal

Introduction

Perhaps because of income limitations, the use of medicinal plants by populations in developing countries remains common, large biodiversity and the resultant availability of medicinal plants, as well as a long tradition of use, contribute to the popularity of medicinal plant use. The World Health Organization (WHO) has estimated that ~65 % of the world population uses plant-derived traditional medicines as their primary health care. Plant products also play an important role in the health care systems of developed countries (Cragg et al. 2009).

One important example is the *Solanum* genus (Solana-ceae family) that is used in a number of cultures. In addition to their nutritional value, *Solanum* species are valued for their medicinal properties (Jain et al. 2011; Vlachoianis et al. 2010). *Solanum cernuum* Vell. is a Brazilian medicinal plant traditionally used in the

treatment of gastric ulcers, hepatic injuries, skin disorders, and as anti-tumor, depurative, diuretic, antihemorrhagic and blennorrhoea agent (Corrêa 1984; Rodrigues and Carvalho 2001). The leaves are also used as an infusion with tranquilizing action for cardiac disorders (Lorenzi and Matos 2000).

Cycloeucalenone (**1**) and 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) are cycloartane triterpenoids and the main constituents of the dichloromethane extract of *S. cernuum* Vell. leaves (Grando et al. 2008). Compound **1** was found in *Tinospora crispa* that has been used in traditional medicine in Asia and Africa for its antipyretic and anti-inflammatory activities. Cardiogenic effects of compound **1** have been demonstrated (Kongkathip et al. 2002; Ramírez-Cisneros et al. 2012), and more recently the cardioprotective effects of *T. crispa* have been described (Praman et al. 2011). Despite the established anti-inflammatory properties of cycloartane triterpenoids (Rajic et al. 2001; Yang et al. 2010) no data have addressed similar effects with compounds **1** and **2**.

Cycloeucalenone (**1**) and 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) were tested against human tumor cell lines and **2** was significantly active and selective against lung tumor cell line NCI-H460. **1** showed less activity (Grando et al. 2008). The high expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in the NCI-H460 cell line documented by Takahashi et al. (2002) supports the continued study of compounds **1** and **2** in inflammation and pain associated with inflammatory process.

In the present work we investigated the pharmacological properties of the dichloromethane extract of *S. cernuum* and of the isolated compounds cycloeucalenone (**1**) and 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**), in animal models of pain and inflammation. These studies have been complemented by in vitro studies.

Materials and methods

Plant material, extraction and isolation

S. cernuum Vell. leaves were collected in Bragança Paulista (SP, Brazil) in September/2004 and Piracicaba (Esalq), in August/2009. The voucher specimens (VELL No 653) are deposited at the herbarium *Frei Velloso* of the São Francisco University (SP, Brazil). The oven-dried and powdered leaves were extracted with dichloromethane by maceration, providing the dichloromethane crude extract (6.7 % (w/w)). Cycloeucalenone (**1**) and 24-oxo-31-norcycloartanone (**2**) were isolated, purified and identified as previously described. Both compounds were chromatographically pure which was confirmed by NMR

spectroscopy and specific optical rotation values (Grando et al. 2008).

Drugs and reagents

The following drugs were used: carrageenan (Sigma-Aldrich, USA), piroxicam (Pfizer, NY, US), dexamethasone (Sigma-Aldrich, US), dimethyl sulfoxide (Synth, Brazil), tween-80 1 % (Sigma-Aldrich, US), acetic acid (Sigma-Aldrich, US), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, US), lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O26:B6 (LPS, Sigma-Aldrich, US).

Experimental animals

Balb/C mice (20–35 g) obtained from CEMIB-Unicamp (Brazil) were maintained in a room with controlled temperature 25 ± 2 °C for 12 h light/dark cycle, with free access to food and water. Animal care, research and animal sacrifice protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Biology Institute/UNICAMP-Ethical Committee for Animal Research.

Acute toxicity

Balb/C and Swiss mice were treated with compounds (**1**) and (**2**) at various doses (10, 30, 100, and 600 mg/kg) by po and ip routes. Groups were observed for the 4 h after administration and then daily for 14 days. The following variables were evaluated: general toxicity signals such as body weight loss, locomotion, behavior (agitation, lethargy), respiration, salivation, tearing eyes, cyanosis and mortality (Souza-Brito 1994).

Acetic acid writhing assay

The DCE extract, compounds (**1**) and (**2**), and vehicle, were administered po at different dose (DCE 100, 300, and 600 mg/kg; (**1**) 50, 100, and 200 mg/kg; (**2**) 10, 50, and 100 mg/kg). Metamizole (200 mg/kg) was administered po. Control (sham group) were administered saline 0.9 %.

Animals were divided into 11 groups of 10 mice, consisting of DCE groups, compound (**1**), compound (**2**), each one with 3 dose of compounds, using metamizole as control/reference group (one dose), and control-sham group. Writhing was induced by an ip injection of 0.8 % acetic acid solution (10 mL/kg), 30 min after treatment. After acetic acid solution injection, the numbers of writhing (abdominal constrictions for nociception evaluation) were cumulatively counted over 15 min. Data represent the

average of the total writhing observed, consortium number and percentage (Spindola et al. 2010).

Carrageenan-induced rat paw edema

Experiments were designed according to Posadas et al. (2004) and Nunes et al. (2007) with several modifications (Vendramini-Costa et al. 2010). Right hind paw basal volume of Balb/C mice ($n = 8/\text{group}$) was measured using a plethysmometer (Panlab, Spain) and then were treated as follows: negative control (vehicle—saline 0.9 %), positive control (piroxicam—20 mg/kg, po), and experimental groups (1) (100 mg/kg) and (2) (50 mg/kg), both po route. After 1 h of treatment, inflammation was induced by inoculation of 40 μL of carrageenan 2.5 % into the right hind footpad and edema was determined by the difference between measured volume and basal volume and evaluated 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 24, 48, and 72 h after carrageenan inoculation. Results are expressed as variations in time of the paw edema (mL).

Cytokine TNF- α production and COX-2 expression in differentiated THP-1 cells

Pro-inflammatory cytokine TNF- α production was quantified in supernatants from THP-1 differentiated macrophages from monocytic phase by PMA addition (200 nM, 24 h). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was made according to the manufacturer's protocol (e-Biosciences, Biomol, PA, USA). Cells were previously stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dexamethasone (3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as anti-inflammatory control. Results were expressed as pg/mL of TNF- α produced in culture supernatants.

For the determination of COX-2 protein expression, first protein concentration of the homogenate was assayed following Bradford's colorimetric method. Aliquots of supernatants containing equal amounts of protein (50 μg) were separated on 10 % acrylamide gel by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In the next step, the proteins were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with specific primary antibodies: COX-2 (M-19, Santa Cruz Biotechnology, CA) at a dilution of 1:1500. Each filter was washed three times for 15 min and incubated with the secondary horseradish peroxidase-linked anti-goat (for COX 2) antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA). To prove equal loading, the blot was analyzed for β -actin expression using an anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich, Mo, USA). Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence light detecting kit (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, IL, USA). For the determination three independent studies were assayed.

Densitometric data were calculated following normalization to the control (house-keeping gene). The signals were analyzed and quantified (ImageJ, Image Analysis Software).

Sirtuin 1 activity assays

The effect of the compounds (1) and (2) in SIRT1 activity was monitored by quantifying the variations of the enzyme activity using the AK555 commercial kit (BIOMOL International, Plymouth Meeting, PA). The in vitro activity assay was performed by incubating recombinant human SIRT1 substrates with NAD⁺ and peptide fluorogenic acetylated Lys382 p53 at 37 °C, in accordance with technical instructions. Fluorescence was measured in a fluorimeter Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek Instruments) with an excitation wavelength of 360 nm and emission of 460 nm. Resveratrol has been used as internal control of activation, and nicotinamide and suramin sodium as inhibitory controls. SIRT1 activity was estimated after performing a calibration line constructed with increasing concentrations of fluorescent deacetylated peptide. Results are expressed in percentage of activity (%).

Statistical analysis

All values in the figures and text are expressed as mean \pm standard error (SEM) of the mean of n observations. For the in vitro studies tables are representative of at least three experiments performed on different experimental conditions. On the acetic acid assay, results were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's t test for multiple comparisons; differences in the test- vs control-values were considered to be statistically significant at $p \leq 0.05$. In the carrageenan-induced paw edema differences in the test- vs control-values were considered to be statistically significant at $p \leq 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ following Duncan's Test. In in vitro studies (SIRT1 activity and TNF- α production) p -value < 0.05 were considered significant and individual group means were then compared with Student's unpaired t test.

Results

Acute toxicity

No evidence of toxicity was observed 4 h after administration of (1) and (2) (10, 30, 100, and 600 mg/kg) by po and ip routes, as well as during the following 14 days, when the animals were kept under observation. Therefore,

the above dosages were considered safe for the following experiments (data not shown).

Animal studies of anti-nociceptive effect

Table 1 shows results of acetic acid writhing reflex test. DCE from *S. cernuum* leaves, (1) and (2) significantly reduced writhings and stretching induced by 0.8 % acetic acid at a dose of 100 and 50 mg/kg, respectively. DCE significantly inhibited the writhing response and was dose dependent with 61.5 % ($p < 0.05$) reduction observed for 300 mg/kg and 74.0 % ($p < 0.001$) for 600 mg/kg. Both compounds show similar activity at dose of 50 mg/kg po (56.4 and 53 %) and are also dose dependent with 88.3 % (1) and 63 % with 100 mg/kg (2) respectively. Metamizole (200 mg/kg/po) had 90.5 % inhibition (Table 1).

Carrageenan-induced edema

From the beginning (1.5 h) to the end of the experiment (72 h), compound (2), at dose of 50 mg/kg (po) significantly inhibited the paw edema induced by carrageenan. Piroxicam (20 mg/kg), employed as the positive control, had a similar profile although less effective than 24-oxo-31-norcycloartanone (2). Both compounds displayed significant anti-inflammatory activity during the early phase of the experiment. Piroxicam partly lost its anti-inflammatory properties at the end of the study (72 h), Fig. 1. After 4.5 h of inflammation induction, (2) was notably more active than positive control, coinciding with the stage of COX-2 production and secretion of prostaglandins. Both (2) and positive control inhibited the second step of inflammation which occurs between 48 and 72 h after induction of carrageenan injection, but in contrast to the positive control, (2) presented inhibitory effect during all the late phase (after 6 h) (Fig. 1).

COX-2 expression, TNF- α production, and SIRT 1 activity

We examined COX-2 expression by western blotting. Both compounds reduced the expression of COX-2 identified in culture supernatants of differentiated macrophages from the THP-1 monocytic line, and stimulated with LPS (1 μ g/mL), although a significant response was detected with compound 2 (24-oxo-31-norcycloartanone), $p < 0.05$ vs LPS group (Fig. 2).

Resveratrol, as activation pattern, and nicotinamide and suramin were used as control of SIRT1 activation and inhibition respectively. Compounds (1) and (2) failed to produce a significant change on SIRT1 enzyme activity. Likewise, the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α in culture supernatants of THP-1 macrophages did not show any significant response after the addition of different compounds (data not shown).

Discussion

The present study showed that oral administration of dichloromethane crude extract (DCE) fraction of the leaves of *S. cernuum* Vell. (300 and 600 mg/kg) produces analgesic/anti-inflammatory effect as evidenced by the significant inhibition on writhing by acetic acid. The study was initiated with an acute toxicity test and revealed lack of toxicity for both compounds. Cycloeucalenone (1) at doses of 50, 100 and 200 mg/kg by oral administration, and 24-oxo-31-nor cycloartanone (2) at doses of 50 and 100 mg/kg po, show an important reduction of the number of contortions. In the paw edema assay, oral 24-oxo-31-nor cycloartanone (2) showed remarkable anti-inflammatory activity detected in early stages of inflammation (1.5–6 h) but also in later periods (48 h).

Table 1 Effect of *S. cernuum* Vell. leaves dichloromethane extract (DCE), cycloeucalenone (1), 24-oxo-31-norcycloartanone (2), and metamizole on writhing induced by acetic acid

Values expressed as mean \pm SEM * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs control group

Anova $F(4,39) = 22.36$ $p < 0.0001$. Dunnet test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Treatment	Dose (mg/kg)	Via	Contortions number (mean \pm st)	% Inhibition
DCE	100	po	33.8 \pm 2.9	38.1
	300		21.0 \pm 7.4	61.5*
	600		14.2 \pm 5.4*	74.0*
Cycloeuca-lenone (1)	50	po	23.8 \pm 7.3	56.4*
	100		4.3 \pm 0.8**	88.3**
	200		4.1 \pm 2.6**	87.7**
24-oxo-31-nor cycloartanone(2)	10	po	34.0 \pm 4.8	37.7
	50		24.7 \pm 2.3*	53.0*
	100		5.2 \pm 3.3**	63.0*
Metamizole	200	po	5.2 \pm 3.3**	90.5**
Control (solution, 0.9 %)	10 mL	po	54.6 \pm 8.3	0

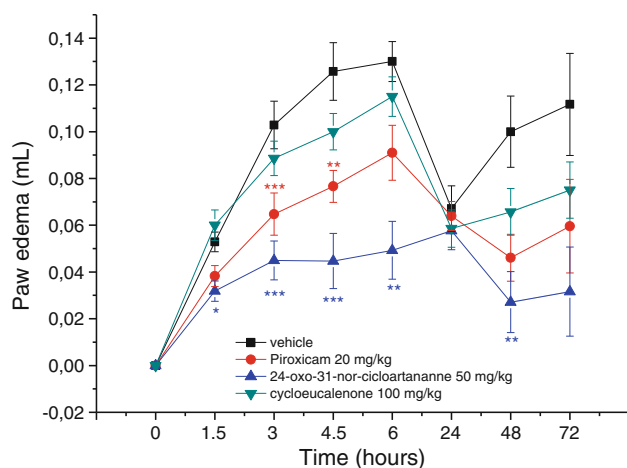


Fig. 1 Effect of cycloeucalenone (1) and 24-oxo-31-nor-cycloartanone (2) on carrageenan-induced paw edema expressed as paw edema (mL) per time after inflammation induction. Mice were treated po with cycloeucalenone (100 mg/kg) (1), 24-oxo-31-nor-cycloartanone (2) (50 mg/kg), saline 0.9 % or piroxicam (20 mg/kg), 1 h before intraplantar carrageenan 2.5 % injection. Paw edema was evaluated in plethysmometer 1.5, 3, 4.5, 6, 24, 48, and 72 h after inflammation induction. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ Duncan's test, statistically different from the group treated with vehicle. ANOVA, $p < 0.01$

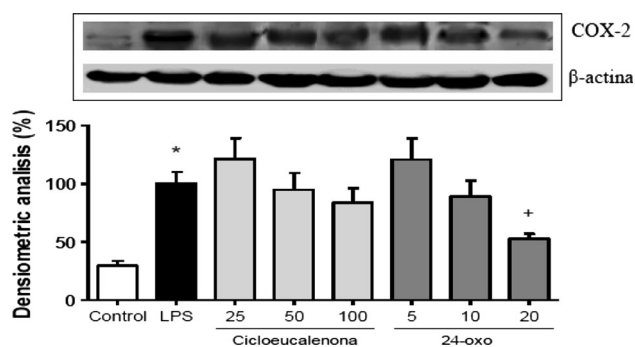


Fig. 2 COX-2 protein expression in THP-1 stimulated cells. Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence light detecting kit. T de Stuent. * $p < 0.05$ vs control; + $p < 0.05$ vs LPS group

The acetic acid writhing test model is a convenient stimulus assay for screening drugs with anti-inflammatory and/or analgesic activity because the intensity of response depends on the interaction of several factors (neurotransmitters/neuromodulators) that determine nociception (Shafiee et al. 2003). Therefore, this model permitted the evaluation of antinociceptive activity produced by both neurogenic and/or inflammatory pain, and respond to analgesic substances possessing the most varied action mechanisms, being sensitive to drugs such as kinin receptor antagonists, opioid analgesics with central or peripheral action, or aspirin (Bjorkman et al. 1995; Spindola et al. 2010). The writhing reduction produced by DCE, cycloeucalenone (1) and

24-oxo-3-nor-cycloartanone (2) maybe a consequence of an anti-inflammatory effect or an action on the conduct of pain signals through the sensory system.

To confirm the anti-inflammatory effects, cycloeucalenone (1) and 24-oxo-3-nor-cycloartanone (2) were evaluated by the carrageenan-induced paw edema model that has been accepted as a useful tool to study systemic anti-inflammatory agents. This model in mice has two distinct phases: the early phase starts immediately after carrageenan injection and lasts for about 6 h while the late phase starts after 6 h and ends at about 72 h after carrageenan injection, with an inflammatory peak being observed between 48 and 72 h (Nunes et al. 2007; Posadas et al. 2004). Serotonin, phospholipase A₂ (PLA₂), histamine, kinins, arachidonate metabolites (prostaglandins, leukotrienes) and nitric oxide (NO) are mediators released in the early phase, while the later phases are suspected to be arachidonate metabolites producing an edema dependent on mobilization of neutrophils (Pedernera et al. 2010; Spindola et al. 2010). The acute inflammatory response is characterized by an increase in vascular permeability and cellular infiltration leading to edema formation, as a result of extravasations of fluid and proteins, and accumulation of leukocytes at the inflammatory site (Posadas et al. 2004). After inflammatory stimuli, mast cells are stimulated to produce histamine, which contributes to vasodilatation and vascular permeability. The inflammatory stimulus also leads to activation and secretion of mediators that include bradykinin and arachidonic acid metabolites such as prostaglandins and leukotrienes (Penissi et al. 2009).

Compound 2 inhibited all inflammatory phases, effects that could result from a reduction of synthesis and/or secretion of mediators in the early inflammatory phase such as histamine and bradykinin, as well as a downstream inhibitory effect, interfering with the production of prostaglandins and leukotrienes, and subsequently an inhibition of leukocytes migration. Effectively, the assay of expression of COX-2 by western blotting demonstrates an inhibition of 24-oxo-31-nor-cycloartanone (2) confirming that its analgesic and anti-inflammatory effect is COX-2-dependent. In comparison with positive control (the NSAID piroxicam) 24-oxo-3-nor-cycloartanone (2) was more active in both phases. Other possible explanations include a late indirect effect on cyclooxygenase activity by inhibiting leukocytes migration.

Considering the chemical structures of compounds 1 and 2 the difference is located at the side chain of the triterpenoids (Fig. 3). The presence of an electron donor, the oxygen atom, in 2 could be the basis of the behavior of this compound in the carrageenan model assay. NAD-dependent protein deacetylase enzymes, Sirtuines (SIRT), are emerging as a novel molecular link between aging and various pathologies including those with an immune

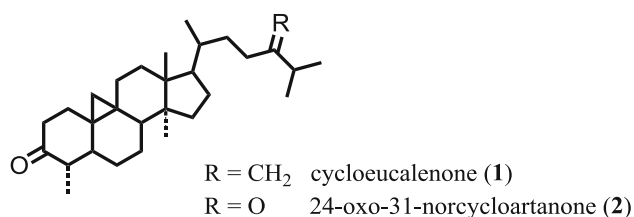


Fig. 3 Chemical structures of the cycloartane triterpenoids: cycloeucalenone (1) and 24-oxo-31-norcycloartanone (2)

component. The SIRT family comprises seven members (SIRT1 to SIRT7); in mammals SIRT1 affects cell survival and proliferation, lifespan, and inflammation through the deacetylation of proteins involved in these processes. Based on this knowledge, evidence suggests a role of SIRT1 in controlling the expression of several inflammatory mediators (Yoshizaki et al. 2009; Yoshizaki et al. 2010). Several recent reports have established the siruin-dependent deacetylation of several transcription factors and specifically have demonstrated a role of SIRT1 in the deacetylation of the nuclear factor NF- κ B. NF- κ B can in turn regulate the expression of many genes involved in cytokines, including TNF- α , and many other regulators of an inflammation process (Ghosh and Hayden 2008; Yeung et al. 2004). There are many products of natural origin that can regulate the SIRT function, including those of terpenoids structure (Dao et al. 2010; Kang et al. 2010). Although the cycloartane triterpenoids from *S. cernuum*, cycloeucalenone (1) and 24-oxo-31-norcycloartanone (2), have demonstrated their anticancer and anti-inflammatory properties, these responses are not related to direct activation of SIRT1. These results could also partly explain the lack of response in the cytokine TNF- α production.

In the present study DCE and the isolated cycloartane triterpenoids showed analgesic activities as evidenced by its significant inhibition on writhing by acetic acid. Some doses of oral cycloeucalenone (1) and 24-oxo-31-norcycloartanone (2) were also evaluated in carrageenan-induced paw edema, a useful tool to study systemic anti-inflammatory agents. The results established an anti-inflammatory activity of 24-oxo-31-nor cycloartanone (2) detected in early stages but also in later periods of inflammation. These results justify the ethnomedical claims. However, more investigations are required for a complete understanding of the mechanism of action.

Acknowledgments This is a collaborative research between groups of different countries and has been partly achieved thanks to REQUIMTE (Portugal) from FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia, to a grant from the Andalusia Government, Spain – Proyecto de Excelencia—Polifanot—P09-AGR- 5185, and to the Programa de Mestrado em Uso Racional de Medicamentos of the Universidade de Sorocaba (Brazil).

References

- Bjorkman S, Akeson J, Helfer M, Fyge A, Gustafsson LL (1995) Cerebral uptake of morphine in the Pig calculated from arteriovenous plasma-concentration gradients—an alternative to tissue microdialysis. *Life Sci* 57:2335–2345
- Corrêa MP (1984) Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro
- Cragg G, Grothaus P, Newman D (2009) Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 109:3012–3043
- Dao T, Le T, Nguyen P, Thuong P, Pham T, Woo E, Lee K, Oh W (2010) SIRT1 inhibitory diterpenoids from the Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*. *Panta Medica* 76:1011–1074
- Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappa B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8:837–848
- Grando R, Antonio M, Araujo C, Soares C, Medeiros M, de Carvalho J, Lourenco A, Lopes L (2008) Antineoplastic 31-norcycloartanones from *Solanum cernuum* Vell. *Zeitschrift für Naturforschung Sect C-A J Biosci* 63:507–514
- Jain R, Sharma A, Gupta S, Sarethy IP, Gabrani R (2011) *Solanum nigrum*: current perspectives on therapeutic properties. *Altern Med Rev* 16:78–85
- Kang N, Zhang J, Qiu F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2010) Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Cancer Lett* 294:147–158
- Kongkathip N, Dhumma-upakorn P, Kongkathip B, Chawanoraset K, Sangchomkao P, Hatthakitpanichakul S (2002) Study on cardiac contractility of cycloeucaleanol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. *J Ethnopharmacol* 83:95–99
- Lorenzi H, Matos FJA (2000) Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da flora Ltda, São Paulo
- Nunes F, Sampaio S, Santoro M, Sousa-E-Silva M (2007) Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon* 49:1090–1098
- Pedernera MA, Guardia T, Calderón C, Rotelli AE, de la Rocha NE, Saad JR, Verrilli MAL, Aseff SGP, Pelzer LE (2010) Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. *Inflammopharmacology* 18:253–260
- Penissi A, Vera M, Mariani M, Rudolph M, Cenal J, de Rosas J, Fogal T, Tonn C, Favier L, Giordano O, Piezzi R (2009) Novel anti-ulcer alpha, beta-unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation. *Eur J Pharmacol* 612:122–130
- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G (2004) Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 142:331–338
- Praman S, Mulvany MJ, Allenbach Y, Marston A, Hostettmann K, Sirirugsa P, Jansakul C (2011) Effects of an n-butanol extract from the stem of *Tinospora crispa* on blood pressure and heart rate in anesthetized rats. *J Ethnopharmacol* 133:675–686
- Rajic A, Akihisa T, Ukiya M, Yasukawa K, Sandeman RM, Chandler DS, Polya GM (2001) Inhibition of trypsin and chymotrypsin by anti-inflammatory triterpenoids from Compositae flowers. *Planta Med* 67:599–604
- Ramírez-Cisneros M, Rios M, Déciga-Campos M, Aguilar-Guadarrama A (2012) phytochemical study and anti-inflammatory, antidiabetic and free radical scavenger evaluations of *Krameria pauciflora* methanol extract. *Molecules* 17:861–872
- Rodrigues VEG, Carvalho DA (2001) Ethnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande, Minas Gerais. *Revista Ciência e Agrotecnologia* 25:102–123

- Shafiee A, Bagheri M, Shekarchi M, Abdollahi M (2003) The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. *J Pharmacol Pharm Sci* 6:359–361
- Souza-Brito A (1994) Manual de Ensaios toxicológicos in vivo. Editora UNICAMP, Campinas
- Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, Eberlin MN, Cabral E, Sousa IMO, Tamashiro JY, Carvalho JE, Foglio MA (2010) Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol* 10:1–10
- Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Achiwa H, Hida T (2002) Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21:177–181
- Vendramini-Costa D, de Castro I, Ruiz A, Marquissolo C, Pilli R, de Carvalho J (2010) Effect of goniothalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg Med Chem* 18:6742–6747
- Vlachojannis JE, Cameron M, Chrubasik S (2010) Medicinal use of potato-Derived products: a systematic review. *Phytother Res* 24:159–162
- Yang XW, Li SM, Wu L, Li YL, Feng L, Shen YH, Tian JM, Tang J, Wang N, Liu YH, Zhang WD (2010) Abiesatrines A-J: anti-inflammatory and antitumor triterpenoids from *Abies georgei* Orr. *Org Biomol Chem* 8:2609–2616
- Yeung F, Hoberg J, Ramsey C, Keller M, Jones D, Frye R, Mayo M (2004) Modulation of NF-kappa B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23:2369–2380
- Yoshizaki T, Milne J, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure J, Lu J, Smith J, Jirousek M, Olefsky J (2009) SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol* 29:1363–1374
- Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure J, Sonoda N, Bae E, Oh D, Lu M, Milne J, Westphal C, Bandyopadhyay G, Olefsky J (2010) SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E419–E428



Cernumidine and isocernumidine, new type of cyclic guanidine alkaloids from *Solanum cernuum*

Luciane C. Lopes^a, Bianca Roman^a, Maria A. Medeiros^b, Abhik Mukhopadhyay^c, Pilar Utrilla^d, Julio Gálvez^d, Sofia García Mauriño^e, Virginia Moltiva^f, Ana Lourenço^{c,*}, Arturo San Feliciano^g

^a Universidade de Sorocaba-UNISO, Programa de Pós-Graduação Strictu Senso em Ciências Farmacêuticas, Rodovia Raposo Tavares, KM 92.5, Cep 18023-000, Sorocaba, SP, Brazil

^b Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Unidade de Energia Solar, Eólica e dos Oceanos UESEO, Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

^c REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

^d CIBER-EHD, Department of Pharmacology, Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain

^e Departamento de Fisiología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

^f Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

^g Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia-CIETUS, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2011

Revised 9 September 2011

Accepted 14 September 2011

Available online 29 September 2011

Keywords:

Alkaloids

Cernumidines

Solanum cernuum Vell.

Interleukin-8

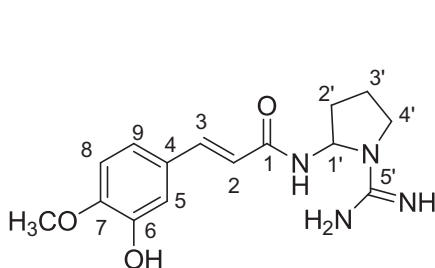
ABSTRACT

Cernumidine and isocernumidine were identified in the ethanol extract of the leaves of *Solanum cernuum* Vell. together with four known phenolic compounds. The alkaloids have a natural (2-aminopyrrolidin-1-yl)carboxamide alkaloidal base acylated with isoferulic (3-hydroxy-4-methoxycinnamic) acid with *Z* and *E* configurations, respectively. The structures were elucidated on the basis of 1D- and 2D-NMR data and the structure of cernumidine was confirmed by X-ray analysis. Cernumidine displayed inhibition of interleukin-8 production by HT-29 colon carcinoma cells. This fact could orient further research in gastric cancer prevention and treatment.

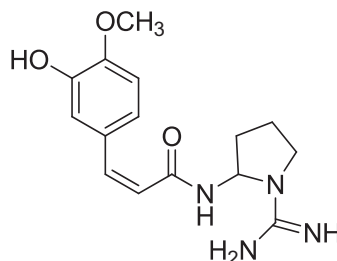
© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Two new alkaloids named cernumidine (**1**) and isocernumidine (**2**) with a (2-aminopyrrolidin-1-yl)carboxamide unit condensed in amide form with *E* or *Z* isoferulic acids [*E/Z*-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)propenoic acid], respectively, were identified in 95% ethanol extract of the dried leaves of *Solanum cernuum* Vell., along with three flavonoid glycosides and caffeic acid.¹ These compounds manifested similar polarity under the chromatographic conditions used. The known phenolic compounds included hyperin,² quercitrin,³ and afzelin.⁴

Compound **1** was isolated as a white amorphous solid. The HRESIMS showed m/z 305.1607 $[M+H]^+$ in accordance with the molecular formula $C_{15}H_{20}N_4O_3$.⁵ The IR spectrum exhibited maximum absorption characteristics of amine, hydroxyl, amide, and aromatic ring moieties. The ¹H NMR spectrum (Table 1) showed the typical pattern for a 3,4-disubstituted cinnamic acid derivative, with signals for the *trans*-disubstituted olefin of the propenoid fragment at δ_H 7.52 (d, J = 15.6 Hz, H-3) and δ_H 6.45 (d, J = 15.6 Hz, H-2) accompanied by those for the ABX (1,2,4-trisubsti-



Cernumidine (**1**)



Isocernumidine (**2**)

* Corresponding author.

E-mail address: ana.lourenco@dq.fct.unl.pt (A. Lourenço).

Table 1NMR spectroscopic data of **1** and **2** (δ_{H} and δ_{C} in $\text{CD}_3\text{OD}^{\text{a}}$ and $\text{DMSO}-d_6$, $^{\text{b}}$ J in Hz) $^{\text{c}}$

Position	1 ^a		1 ^b		2 ^a	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		170.0		167.2		171.1
2	6.45 d (15.6)	117.6	6.42 d (15.6)	117.2	5.81 d (12.6)	120.6
3	7.52 d (15.6)	144.4	7.42 d (15.6)	141.8	6.68 d (12.6)	140.9
4		129.0		127.1		129.4
5	7.05 br s	114.6	6.99 br s	113.5	7.08 d (1.9)	117.4
6		148.0		149.8		147.1
7		151.3		146.8		150.0
8	6.92 d (8.3)	112.5	6.95 d (8.0)	112.1	6.82 d (8.4)	111.9
9	7.01 dd (8.3, 1.2)	122.7	7.00 d (8.1)	120.9	6.91 dd (8.3, 1.8)	123.7
1'	5.78 d (5.2)	65.4	5.65 m	63.6	5.68 d (6.2)	65.3
2'A	2.30 m	33.4	2.18 m	32.0	2.20 m	33.0
2'B	2.03 m		2.04 m		2.11 m	
3'A	2.30 m	23.7	2.18 m	22.4	2.20 m	23.7
3'B	2.14 m		1.90 m		2.05 br s	
4'A	3.57 m	48.1	3.44 m	47.0	3.44 m	48.2
4'B	3.40 m		3.31 m		3.33 m	
5'		156.7				156.7
OCH ₃ -7	3.86 s	56.4	3.79 s	154.6	3.80 br s	56.4
CON-H			9.05 d (8.2)			
Ar-OH			9.27 br s			

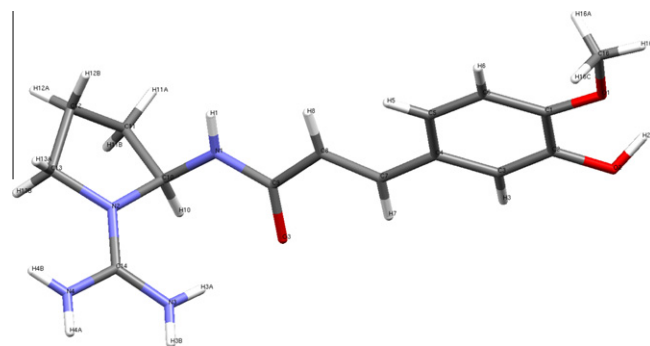
^c Assignments were confirmed from the ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC, and irradiation experiments. ^1H RMN and ^{13}C NMR data were measured at 400 MHz and 100.5 MHz.

tuted) aromatic system at δ_{H} 7.05 (br s, H-5), 7.01 (dd, $J = 8.3$, 1.2 Hz, H-9) and 6.92 (d, $J = 8.3$ Hz, H-8). A methoxy signal observed at δ_{H} 3.86 (s, OCH₃-7) was assigned at the *para* position on the basis of heteronuclear 2D NMR correlations. The methyl protons of the methoxyl group are correlated in HMBC with carbon C-7 (δ 151.3 ppm) (Table 1) that in turn correlates with both H-5 (δ 7.05 ppm) and H-9 (δ 7.01 ppm). These couplings are in agreement with the position of the methoxyl group at C-7. From the HMQC spectrum the direct assignments of signals for C-2 (δ_{C} 117.6), C-3 (δ_{C} 144.4), C-5 (δ_{C} 114.6), C-8 (δ_{C} 112.5), C-9 (δ_{C} 122.7), and OCH₃-7 (δ_{C} 56.4) were possible. The assignments were confirmed by the HMBC spectrum and the three non-protonated aromatic carbon atoms were also unequivocally assigned by their correlations (see Supplementary data). Two other signals present in the HMBC spectrum correlate the H-2 and H-3 protons with the carbonyl carbon atom C-1 (δ_{C} 170.0). This chemical shift value for a carbonyl group was in agreement with the frequency for the absorption band of the amide carbonyl in the IR spectrum (ν_{max} 1653 cm^{-1}). All these facts and assignments supported the presence of a *trans*-isoferyl moiety as the acyl part of the aforementioned amide group. The remaining signals of the ^{13}C NMR spectrum corresponded to one non-protonated carbon atom, one methine, and three methylene carbon atoms as indicated by DEPT experiment. The signal associated with the non-protonated carbon atom appeared at δ_{C} 156.7, (C-5') and is characteristic for a carbon atom of the guanidine group, whose presence was also supported by the positive test with the Sakaguchi reagent.⁶ In the HMQC spectrum the methine (δ_{C} 65.4, C-1') presented its corresponding proton signal at δ_{H} 5.78 (d, $J = 5.2$ Hz) that, in the HMBC spectrum, correlated with that of C-1 and with all the three methylene carbons, thus supporting its location in a pyrrolidine heterocycle connected to the nitrogen of the amide group. The pyrrolidine nitrogen should then be attached to the remaining atoms of the structure, a formamidine fragment, thus configuring the guanidine moiety. The HMQC data, and the HMBC correlations allowed the assignment of the pyrrolidine nucleus (see Supplementary data). For double confirmation of the proposed *N*-(2-pyrrolidinyl)isoferylamide substructure, further ^1H irradiation experiments were performed. Irradiation of the signal at δ_{H} 2.30 (H-2'A and H-3'A) clearly simplified all the other ring proton signals. The most notorious modification was observed for the H-1'signal,

which became a singlet, denoting the coupling with H-2'A. Similarly, irradiation at δ_{H} 5.78 only affected the signal at δ_{H} 2.30. Irradiation at δ_{H} 3.57 and δ_{H} 3.40 (H-4'A and H-4'B) simplified the signal at δ_{H} 2.30 assigned to H-2'A and H-3'A. Irradiation at δ_{H} 2.14 and δ_{H} 2.03 (H-3'B and H-2'B) simplified the multiplet at δ_{H} 2.30 (H-2'A and H-3'A). These and other changes observed under double irradiation experiments over the ^1H NMR spectrum of (**1**) also supported the above mentioned assignments.

To assure the coupling between H-1' and the amide proton, the ^1H NMR spectrum was run in DMSO- d_6 . In such conditions the ^1H NMR spectrum presented two additional signals at δ_{H} 9.27 (br s) and δ_{H} 9.05 (d, $J = 8.2$ Hz). Irradiation at δ_{H} 9.05 simplified the signal at δ_{H} 5.65 (m, H-1') and irradiation of the latter changed the former signal into a singlet, signifying that the doublet was due to the coupling of the N-H amide with H-1'. Irradiation at δ_{H} 9.27 failed to cause any change in the spectrum, indicating that this signal should correspond to the phenolic hydroxyl group of the isoferyl moiety. These data together with the cross-peaks observed in the ^1H - ^1H COSY spectrum led to the assignment of structure **1** for cernumidine as (*E*)-*N*-(1-carbamimidoylpyrrolidin-2-yl)isoferylamide. The proposed structure for cernumidine (**1**) was confirmed by X-ray diffraction analysis (see Fig. 1).⁵

Cernumidine (**1**) showed a positive specific optical rotation, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +10.9$ (c 0.84, MeOH), and the X-ray analysis revealed the existence of a racemic entity. This behavior is known, as discussed by

**Figure 1.** X-ray crystal structure of cernumidine (**1**).

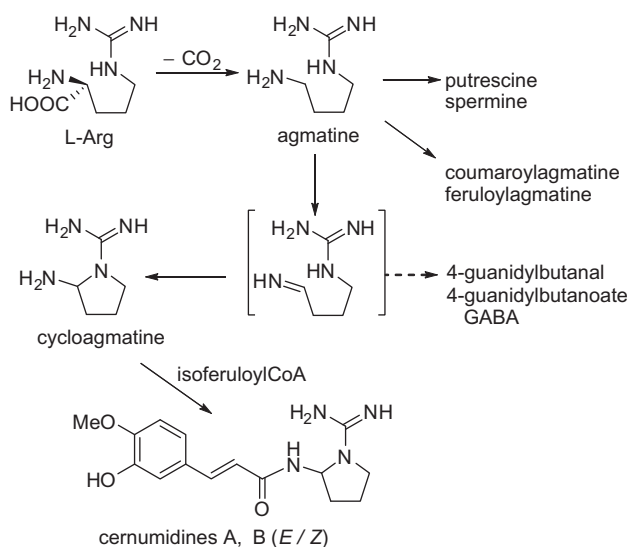
Flack and Bernardinelli.⁷ It is considered that the sample of cernumidine (**1**) is a mixture of enantiomers with a small enantiomeric excess of the *dextro* form and for that it displays a positive optical rotation value.

In these alkaloids the aminal between the nitrogens of the amide and the guanidine is unstable so that it is possible that isomerisation of the chiral center occurred during crystallization. To prove the reactivity of the aminal the ¹H NMR spectrum of cernumidine (**1**) was registered in D₂O with the addition of a minute amount of DCl. After 1 h at 60 °C there was a significant decrease of intensity in the methine H-1' signal (δ 5.78, d, J = 5.2 Hz). This can be explained by the formation of an acylimine that could lead to racemization.

Isocernumidine (**2**) was isolated as a colorless oil. The ESI-TOF-MS showed m/z 304.1531 [M]⁺.⁸ From comparative analysis of ¹H and ¹³C NMR data of both the compounds **1** and **2**, the main differences observed corresponded to the olefin related resonances, which for compound **2** was consistent with the *Z* configuration: δ_H 6.68 (d, J = 12.6 Hz, H-3), δ_H 5.81 (d, J = 12.6 Hz, H-2), δ_C 140.9 (C-3), and δ_C 120.6 (C-2). The occurrence of *E/Z* isomerism in natural cinnamoyl structures is common⁹ and the observed coupling constants at the protons H-2 and H-3 for both compounds, also support the *E* and *Z* configuration for **1** and **2**. All the assignments of ¹H and ¹³C NMR data were similarly made by HMQC and HMBC analyses in comparison with compound **1**. This resulted in the structure of (*Z*)-*N*-(1-carbamimidoylpyrrolidin-2-yl)isoferulamide for isocernumidine (**2**) (see Supplementary data).

The structures of cernumidine (**1**) and isocernumidine (**2**) are quite unexpected in light of known hydrocinnamic acid amides of natural guanidines, and their formation in vivo should be understood. From the biosynthetic point of view the route to cernumidines is intriguing due to the presence of the 2-aminopyrrolidin-1-ylcarboxamidine unit that has never been reported to be associated with these types of cinnamic amide structures. Relating to the 3-hydroxy-4-methoxyphenylpropanoid (isoferulic) fragment, its presence is common in flavonoid and quinic acid glycosides, acylated alkaloids, and other types of natural compounds and would probably be formed through 4-O-methylation of caffeic acid. Hydrocinnamic acid amides are often formed by the condensation of hydroxycinnamoyl-CoA thioesters with phenylethylamines or polyamides.¹⁰ The condensation of coumaroyl and feruloyl analogs with agmatine is also known to occur.^{10–13} The oxidative deamination of arginine to 2-oxoarginine followed by decarboxylation through a well established pathway leads to 4-guanidylbutanal, the probable intermediate for the biosynthesis of a number of cyclic guanidine (pyrrolidinylcarboxamidine) alkaloids. Nevertheless, the presence of the amino group at position C-2 of the resulting pyrrolidinecarboxamidine, present in the cernumidines cannot easily be explained on such basis. Consequently, in order to explain such different structural arrangement, we propose the complementary biosynthetic route depicted in Scheme 1, in which an alternate route (broken arrow) to 4-guanidylbutanal is also presented. In the new sequence C-oxidation/dehydration of agmatine would lead to the intermediate guanidylbutylimine shown, which could cyclize to the 2-aminopyrrolidine derivative named cyclo agmatine in the scheme. Cyclo agmatine would be stabilized by acylation with *E*- or *Z*-isoferuloyl-CoA to produce cernumidine (**1**) and isocernumidine (**2**), respectively. According to this scheme the imine intermediate or its C-oxidized precursor could directly lead to 4-guanidylbutanal and then to 4-guanidylbutanoic acid and GABA.

Representative compounds such as feruloyl- and 4-coumaroyl derivatives of tyramine and octopamine have been found in *Solanum* species such as *Solanum tuberosum* and *Solanum melongena*.¹⁴ Compounds that possess a hydroxycinnamic acid condensed through an amide and are containing a guanidine function, display



Scheme 1. Proposed biosynthesis for cernumidine (**1**) and isocernumidine (**2**).

pharmacologic properties such as antifungal,¹⁵ and hypotensive activities.¹⁰ One of the purposes of our work is to search for anti-inflammatory and anticancer agents. In the present study, we explored the anti-inflammatory action and the potential carcinogenicity activity of a new guanidine alkaloid that was found in *S. cernuum* Vell. This Solanaceae is endemic to Brazil and grows spontaneously in the states of Rio de Janeiro and Minas Gerais, and plays an important role in traditional medicine of the Brazilian states where it grows. Infusions of the aerial parts of *S. cernuum* Vell. are used in the treatment of gastric ulcers, liver injuries, and skin infections and also as antitumour, depurative, diuretic, anti-hemorrhagic, and antileptorrhagic agents.^{16,17,1}

Among other experimental studies, the action of cernumidine (**1**) was evaluated in the production of the proinflammatory chemokine interleukin-8 (IL-8), by HT-29 colon carcinoma cells, whose expression is primarily regulated through NFκB-mediated transcriptional activity.¹⁸ The induction of IL-8 activates multiple signaling pathways whose consequences are the promotion of angiogenic responses, increase of proliferation, and survival of cancer cells and potentiates metastatic migration (see review 19). Therefore, inhibiting the production of IL-8, or its signaling effects, may constitute a significant therapeutic intervention by targeting the tumor microenvironment. Interestingly, the in vitro experi-

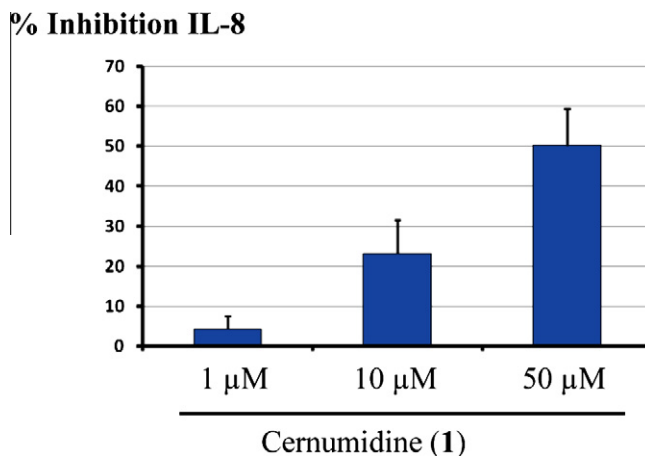


Figure 2. Inhibitory effects of cernumidine (**1**) on IL-8 production in HT-29 cells.

ments on colorectal carcinoma cells (HT-29) demonstrated that the presence of cernumidine (**1**) decreased the generation of IL-8 in a concentration dependent manner attaining up to 50% reduction at a 50 μ M concentration (Fig. 2). However, in macrophages THP-1 cells, cernumidine (**1**) failed to inhibit TNF- α production and showed no appreciable activity as an electron or radical scavenger.

Potential carcinogenicity prevention of the cernumidines was assayed through the evaluation of regulation of sirtuin-1 (SIRT1) enzyme activity.²⁰ SIRT1 has been suggested to play a role in tumorigenesis, although its pleiotropic effects during cancer development suggest a rationale for the use of SIRT1 activators and inhibitors in the prevention and treatment of colon cancer.^{21,22} Cernumidine (**1**) and isocernumidine (**2**) failed to produce a significant change on SIRT1 enzyme activity in our assays.

Cernumidine (**1**) was also tested in vitro against Gram+ and Gram- bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*), and for antineoplastic cytotoxicity against ten cancer cell lines (U251, glioma; UACC-62, melanoma; MCF-7, breast; NCI-ADR/RES, ovary; 768-0, kidney; NCI-H460, lung; PC-3, prostate, OVCAR-3, ovary; HT-29, colon, and K562, leukemia cells). Both antimicrobial and antineoplastic cytotoxicity studies gave negligible results.

From the structural point of view the guanidine subunit can be responsible for hydrogen bond mediated interactions due to its significant basic character. The guanidine function of cernumidine (**1**) and isocernumidine (**2**) can be more basic due to the alkylene substitution. Nevertheless, this structural feature does not seem to have a relevant influence on the bioactivity of cernumidine. The biological importance of cernumidines for the producing plant species is still unknown, however, the fact that these substances do not significantly influence most of the functions involved in the above mentioned assays, can be a valuable property for a potential selective application considering the compound role over IL-8 generation. This understanding is underlying our ongoing medicinal chemical studies on cernumidines as lead compounds.

Acknowledgments

This is a collaborative research between groups of different countries and has been partly achieved. Thanks to REQUIMTE (Portugal) from FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia, from a grant from the Spanish Government—A/023115/09—Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo and the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2008-02616) with funds from the European Union, and Junta de Andalucía (CTS 164). The CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tetlet.2011.09.060.

References and notes

- Alves, T. M. A.; Marengo, S.; Machado, C.; Caldeira, R.; Carvalho, O.; Isaías, R. M. S.; Stehman, J. R.; Zani, C. *Rev. Bras. Farmacocogn.* **2007**, *17*, 542–548.
- Ming-hua, Y.; Ling-yi, K. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 98–99.
- Markham, K.; Geiger, H.; Jaggy, H. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1009–1011.
- Correia, S. d. J.; David, J. M.; da Silva, E. P.; David, J.; Lopes, L. M. X.; Guedes, M. L. S. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2056–2059.
- Cernumidine (**1**): White amorphous solid; $[\alpha]_{20}^D +10.9$ (c 0.84, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3358, 2941, 1653, 1602, 1510, 1412, 1337, 1269, 1119, 1021, 977 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100.5 MHz), Table 1; ESI-TOFMS m/z 305.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRESIMS m/z 305.1607 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$, 305.1614). Crystal data: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$, yellow plate like crystals from methanol $M = 361.34$, monoclinic, $a = 17.577(4)$ Å, $b = 9.7166(19)$ Å, $c = 10.234(2)$ Å, $\beta = 91.77(3)^\circ$, $V = 1747.1(6)$ Å³, $T = 293(2)$ K, space group $P2_1/c$, $Z = 4$, $\mu = 0.107$ mm⁻¹, 44133 reflections measured, 3064 independent reflections ($R_{\text{int}} = 0.0333$). The final R_1 values were 0.0425 ($I > 2\sigma(I)$) and 0.0539 (all data), and the final $wR(F^2)$ values were 0.1518 ($I > 2\sigma(I)$) and 0.1816 (all data). The goodness of fit on F^2 was 1.492. No hydrogen atoms were refined anisotropically. $-\text{NH}_2$ hydrogens or N3 or N4 were disordered and were modeled both on N3 and N4 (Fig. 2). CCDC structure deposition code 820767.
- Egon Stahl, E. *Thin-layer Chromatography. A Laboratory Handbook*; Springer: Berlin, 1969.
- Flack, H.; Bernardinelli, G. *Chirality* **2008**, *20*, 681–690.
- Isoernumidine (**2**): Colorless oil; $[\alpha]_{20}^D -8.2$ (c 0.37, MeOH); IR (NaCl) ν_{\max} 3331, 3221, 2940, 1650, 1600, 1511, 1436, 1269, 1225, 1127, 1021 cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (100.5 MHz) NMR, Table 1; ESI-TOFMS m/z 305.1531 $[\text{M}]^+$.
- Munoz, O.; Piovano, M.; Garbarino, J.; Hellwing, V.; Breitmaier, E. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 709–713.
- Botta, B.; Carmignani, M.; Volpe, A.; Botta, M.; Corelli, F.; Delle Monache, G. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1845–1862.
- Bell, E.; Tirimann, A. *Biochem. J.* **1964**, *91*, 356–358.
- Funk, C.; Brodelius, P. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 256–262.
- Peipp, H.; Maier, W.; Schmidt, J.; Wray, V.; Strack, D. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 581–587.
- Facchini, P.; Hagel, J.; Zulak, K. *Can. J. Bot.* **2002**, *80*, 577–589.
- Jin, S.; Yoshida, M. *Biosci. Biotech. Bioch.* **2000**, *64*, 1614–1617.
- Araujo, C. E. P.; Rodrigues, R. F. O.; Oliveira, F.; Schreiner, L. *Acta Farm. Bonaerense* **2002**, *21*, 283–286.
- Esteves-Souza, A. E.; Silva, T. M. S.; Alves, C. C. F.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 838–842.
- Cario, E.; Rosenberg, I.; Brandwein, S.; Beck, P.; Reinecker, H.; Podolsky, D. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 966–972.
- Waugh, D.; Wilson, C. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735–6741.
- Smith, J.; Brachmann, C.; Celic, I.; Kenna, M.; Muhammad, S.; Starai, V.; Avalos, J.; Escalante-Semerena, J.; Grubmeyer, C.; Wolberger, C.; Boeke, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 6658–6663.
- Stükel, W.; Peh, B. K.; Tan, Y. C.; Nayagam, V. M.; Wang, X.; Salto-Tellez, M.; Ni, B.; Entzeroth, M.; Wood, J. *Biotechnol. J.* **2007**, *2*, 1360–1368.
- Kabra, N.; Li, Z.; Chen, L.; Li, B.; Zhang, X.; Wang, C.; Yeatman, T.; Coppola, D.; Chen, J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18210–18217.